

UNIVERSITE DE MONTPELLIER

FACULTE DES SCIENCES

THESE

présentée à la Faculté des Sciences de Montpellier
pour obtenir le grade de Docteur de l'Université (Sciences Naturelles)

REPLICATION ET MORPHOLOGIE
DU
VIRUS DE LA DENSONUCLEOSE

par

Jean-René COTE

Soutenue le 19 juin 1969 devant la Commission d'Examen.

Jury:

Professeur O. Tuzet, Président

Professeur C. Vago, Assesseur

Professeur L. Euzet, Assesseur

Professeur E. Kurstak, Faculté de Médecine
de Montréal. Invité



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551917_0027

UNIVERSITE DE MONTPELLIER

FACULTE DES SCIENCES

THESE

présentée à la Faculté des Sciences de Montpellier
pour obtenir le grade de Docteur de l'Université (Sciences Naturelles)

REPLICATION ET MORPHOLOGIE
DU
VIRUS DE LA DENSONUCLEOSE

par

Jean-René COTE

Soutenue le 19 juin 1969 devant la Commission d'Examen.

Jury:

Professeur O. Tuzet, Président

Professeur C. Vago, Assesseur

Professeur L. Euzet, Assesseur

Professeur E. Kurstak, Faculté de Médecine
de Montréal. Invité

UNIVERSITEIT DE WITTENBERG

LIBRARY OF THE UNIVERSITY

1811

Reception of the University of Wittenberg
from the University of Wittenberg

RECEPTION OF THE UNIVERSITY

OF

WITTENBERG



1811

Reception of the University of Wittenberg

1811

Reception of the University of Wittenberg
from the University of Wittenberg
from the University of Wittenberg
from the University of Wittenberg
from the University of Wittenberg

AVANT-PROPOS

Trois années se sont maintenant écoulées depuis le début de ce travail qui n'aurait pu être réalisé sans le concours de plusieurs personnes qui m'ont aidé par leurs conseils et leur assistance.

* * *

Je remercie particulièrement, les honorables membres du jury, d'avoir si aimablement accepté de consacrer le temps nécessaire à cette tâche, en plus de leurs lourdes charges professionnelles:

le professeur Odette Tuzet, président du jury et rapporteur de cette thèse, dont le dévouement m'a été d'un si précieux secours;

le professeur Edouard Kurstak qui a dirigé ce travail effectué dans ses laboratoires de la faculté de médecine de l'Université de Montréal, et qui jour après jour, m'a guidé et soutenu;

le professeur Constantin Vago qui m'a conseillé d'entreprendre cette thèse sur un sujet qui lui est cher, et qui a ouvert la voie menant à sa réalisation;

le professeur L. Euzet qui a bien voulu accepter de faire partie du jury.

* * *

L'accueil chaleureux qu'a fait à ce travail, le professeur Sorin Sonea, directeur du département de Microbiologie et d'Immunologie de la Faculté de Médecine de l'Université de Montréal, doit être spécialement souligné.

Le docteur Gilles Richer, professeur d'immunologie à l'Université de Montréal, m'a fait bénéficier de sa grande compétence dans l'analyse d'une partie des données immunologiques contenues dans cette thèse.

Il n'est pas possible, dans les limites de cet avant-propos, de citer tous ceux qui m'ont apporté leur aide, mais l'assistance de mesdemoiselles Françoise Pessey et Dolorès Guérette doit être retenue.

**Professeurs de la Faculté des Sciences
de l'Université de Montpellier**

Doyen	A. CASADEVALL
Délégué au Conseil de l'Université	CH. SAUVAGE
Premier Assesseur	
Délégué au Conseil de l'Université	P. DUMONTET
Deuxième Assesseur	
Directeur du Collège Scientifique universitaire de PERPIGNAN	J. RABINOVITCH
Directeur de l'I.P.E.S.	M. MAURIN
Chef des Services Administratifs	E. SIAU

* * *

Doyen honoraire: P. MATHIAS

Professeurs honoraires:

R. JACQUES	J. SOULA
M. CASTERAS	G. DENISOT
E. CARRIERE	J. GRANIER
E. TURRIERE	CH. BOUHET

Professeurs titulaires:

M. M. MOUSSERON	Chimie Organique
M. J.P. ROIG	Physique
M. P. CHATELAIN	Minéralogie et Cristallographie
Mle O. TUZET	Zoologie
M. G. COUCHET	Mécanique Supérieure
M. J. SALVINIEN	Chimie-Physique
Mle A.M. VERGNOUX	Physique
M. J. AVIAS	Géologie

M. P. VIELES	Chimie
M. J. RABINOVITCH	Physique (C.S.U.P.)
M. E. KAHANE	Chimie Biologique
M. J.J. MOREAU	Mécanique Rationnelle
M. B. CHARLES	Mathématiques pures
M. J. MOTTE	Biologie Végétale
M. R. JOUTY	Physique
M. P. DUMONTET	Physique
M. R. LEGENDRE	Zoologie
M. I. ASSENMACHER	Physiologie Animale
M. A. CASADEVALL	Chimie Organique
M. B. PISTOULET	Physique
M. Ch. ROUMIEU	Analyse supérieure
M. J. ROBIN	Physique
M. A. POTIER	Labor. des Acides Minéraux
M. R. LAFONT	Physique
M. R. JACQUIER	Chimie
M. J. FALGUEIRETTES	Minéralogie
M. J. REGNIER	Chimie
Mme J. CHARLES	Mathématiques
M. P. CAILLON	Physique
M. J. ROUZAUD	Chimie
M. Ch. SAUVAGE	Botanique
M. H. CHRISTOL	Chimie (E.N.S.I.)
Mme G. VERNET	Biologie animale
M. L. CECCHI	Physique
M. H. ANDRILLAT	Astronomie
M. M. SAVELLI	Physique
M. M. MATTAUER	Géologie
M. L. EUZET	Zoologie (C.S.U.P.)
M. C. DELOUPY	Physique
M. L. GRAMBAST	Botanique
M. A. BONNET	Botanique

Professeurs sans chaire

Mme M.L. POUQUES	Botanique (C.S.U.P.)
M. P. MURAOUR	Géophysique Appliquée
M. G. TOURNE	Chimie
M. J. REMY	Géologie
M. P. DEMANGEON	Géologie
Mme S. ROBIN	Physique
Mme Ch. DUBOUL-RAZAVET	Géologie (C.S.U.P.)
M. E. GROUBERT	Physique
Mme H. GUASTALLA	Biologie Physico-Chimique
M. G. LAMATY	Chimie
M. F. PROUST	Géologie
Mle A. BAILLETTE	Mathématiques (C.S.U.P.)
M. A. BASSOMPIERRE	Physique
M. R. MARTY	Psychophysiologie
M. M. MAURIN	Chimie
M. N. ROBY	Mathématiques
Mme N. PARIS	Physiologie Végétale

Professeurs Associés

M. E. AKUTOWICZ	Mathématiques
M. A. MICALI	Mathématiques
M. C. VAGO	Biologie animale
M. K. KOHLER	Biochimie
M. C. QUATE	Physique

Maîtres de Conférences

M. R. GAUFRES	Chimie
M. J.J. SOULIER	Chimie (C.S.U. P.)
M. J. PARIS	Zoologie
M. P. MOLINO	Mathématiques
M. G. BOUGNOT	Physique
M. Y. GUITTON	Physiologie végétale (C.S.U. P.)
M. G. BOMBRE	Physique (C.S.U. P.)

M. C. PUISSEGUR		Biologie Animale (C.S.U. P.)
M. P. VIALLET		Chimie (C.S.U. P.)
M. J.M. MORETTI		Chimie
M. L. THALER		Géologie
M. J. LEGRAND		Physiologie animale
M. M. ROUZEYRE		Physique
M. P. SABATIER		Mathématiques
M. Ch. CASTAING		Mathématiques
M. J.D. BAYLE		Physiologie animale
Mme M. HAKIM		Mathématiques
M. R. HAKIM		Mathématiques
M. M. BAUSSET		Mathématiques (C.S.U.)
M. J.M. MORETTI		Chimie
M. G. LOUPIAS		Mathématiques
M. G. MASCHERPA		Chimie

Maîtres de Conférences Associés

M. Y. CORMARY		Géologie
M. D. DULL		Chimie

Chargés d'Enseignement

M. M. LEFRANC		Mathématiques
Mlle Ch. BARBANCE		Mathématiques (C.S.U.)

* * *

TABLE DES MATIERES

Avant-propos

Table des matières

Introduction 1

Chapitre I

**Revue bibliographique de la réplication et de la morphologie des virus
d'insectes en microscopie électronique.**

Virus à corps d'inclusion

Polyédries nucléaires 9

Polyédries cytoplasmiques 10

Granuloses 11

Maladies à fuseaux 11

Virus sans corps d'inclusion

Virus irisants 12

La paralysie de l'abeille 14

Le virus Sigma de la Drosophile 14

Le virus de la denso nucléose 15

Chapitre II

**Revue bibliographique des principales méthodes utilisées dans l'étude
des virus.**

Etude de la réplication virale

Techniques histopathologiques 19

Culture des tissus 19

Techniques histochimiques 20

Digestions enzymatiques 21

Techniques immunochimiques 22

Autoradiographie 24

Etude de l'ultrastructure virale

Purification et concentration	25
Visualisation de l'ultrastructure	26
Ombrage métallique	27
Coloration négative	28
Superposition périodique	29

Chapitre III

Matériel et méthodes

L'hôte	32
L'agent infectieux	32
Histopathologie	33
Digestions enzymatiques	35
Conjugaison d'anticorps anti-VDN	36
Autoradiographie	37
Purification et concentration du virus	37
Microscopie électronique – coupes fines	38
Microscopie électronique – virus purifié	39
Microscopie électronique – examen	41

Chapitre IV

Résultats

Réplication du virus de la denso nucléose

Histopathogénèse de l'infection virale causée par le virus de la denso nucléose	44
Immunofluorescence	44
Immunoperoxydase	44
Immunodiffusion	45
Coloration à l'orangé d'acridine	45
Réaction de Feulgen	46
Digestions enzymatiques	47
Figures	48

Microscopie électronique sur coupes fines

Etude de la réplication virale au niveau de l'hypoderme	52
Etude de la réplication virale au niveau des glandes séricigènes	52
Immunoperoxydase	53
Autoradiographie	54
Figures	56

Morphologie du virus de la densonucléose

Virus purifiés par la méthode de centrifugation préparative – ou – obtenus à partir d'hémolymphe de larves infectées et préparées par les méthodes rapides de diagnostic	78
Virus préparés et purifiés par la méthode de centrifugation différentielle. . .	79
Virus préparé et purifié par la méthode de centrifugation en gradient de densité en sucrose	80
Résultats obtenus à partir de particules virales montées sur des trous- supports	81
Morphologie des capsomères	81
Disposition spatiale des capsomères	82
Superposition périodique, par rotation, des images du virus de la densonucléose et de celles de son modèle	83
Figures	84

Chapitre V

Discussion et conclusion	105
Bibliographie	113
Appendice	133

INTRODUCTION

Aristote rapportait, dans son "Histoire des Animaux", les premières observations des maladies de l'abeille. A travers les âges, les naturalistes se sont souvent attachés à décrire les manifestations pathologiques chez les insectes, et ces documents historiques marquent autant de jalons sur la route clairsemée de l'acuité humaine.

C'est en 1826 que la science contemporaine ouvrit un nouveau chapitre, celui de la pathologie des insectes (Kirby, 1826). Trente ans plus tard, Maestri (1856) et Cornalia (1856) avaient su observer des formations polyédriques rencontrées lors de leurs travaux sur la grasserie. L'oeuvre de Pasteur (1870 a,b) sur les maladies des vers à soie, mit en évidence le rôle important réservé au microscope dans l'étude des insectes malades.

Les décades qui suivirent connurent, à un rythme accéléré, le développement de la science expérimentale, appuyé sur une instrumentation qui se créait parallèlement aux acquisitions nouvelles des sciences physiques. Les travaux de deBroglie (1924) et de ses élèves ont conduit à ceux de Knoll et Ruska (1931, 1932 a, 1932 b) et à la réalisation d'une des plus séduisantes conquêtes du génie, l'optique électronique, qui venait couronner un potentiel impressionnant de nouveaux appareils d'investigation dont les chercheurs s'étaient entourés lors des dernières décennies.

Les premières observations au microscope électronique des polyèdres de viroses d'insectes furent rapportées par Glaser et Stanley (1943) lors de leur étude biochimique du virus et des corps d'inclusion de la jaunisse du ver à soie.

L'absence, à cette époque, de techniques de préparation assurant un meilleur contraste et la mise en relief des échantillons, ajoutée aux difficultés inhérentes à l'identification des premières particules virales, devaient laisser les micrographies de polyèdres de Glaser et Stanley au rang des curiosités. Réalisées avec la collaboration des pionniers de la microscopie électronique sur le continent américain, ces images témoignent de l'importance attachée, dès ce moment, aux données morphologiques de la virologie et aux nouvelles possibilités des lentilles électroniques.

Ainsi, le microscope électronique a contribué au développement extrêmement rapide de nos connaissances des virus d'insectes, comme on pourra le constater d'après les travaux de différents auteurs que nous citerons plus loin.

C'est cet instrument qui est à la base des recherches que nous nous sommes proposés de présenter dans ce mémoire. Ayant choisi l'étude de la réplication et de la morphologie d'un des plus petits virus connus actuellement, soit le virus de la densonucléose découvert récemment (Meynadier et al. 1964), nous avons été conscient des difficultés qui se présenteraient. Cependant, les premiers travaux de Kurstak et al. (1967, 1968 d), indiquant que

ce virus d'insecte induisait des effets cytopathogènes chez des cellules de mammifères, et la ressemblance morphologique de ce virus avec certains virus de vertébrés, justifiaient qu'on lui porte un intérêt particulier.

A partir de ces données, nous avons cherché dans ce travail, à l'aide du microscope électronique, à connaître les étapes de la réplication du virus chez son hôte d'origine, les larves de *Galleria mellonella* (Lepidoptera), puis à établir son ultrastructure.

Dans le cas de la réplication, les résultats obtenus ont été comparés avec ceux réalisés en microscopie photonique. Parmi les différentes techniques utilisées pour mener à bien ce travail, citons en particulier l'autoradiographie, l'histochimie, la conjugaison d'anticorps anti-virus aux enzymes, l'ultracentrifugation en gradient de densité, la superposition d'images de structures périodiques du virus de la denso nucléose, l'utilisation de modèles analogues, etc.

A la fin de ce mémoire, nous présenterons une proposition de classification du virus de la denso nucléose, basée sur son ultrastructure et ses propriétés physicochimiques. Une tendance prononcée s'affirme actuellement, voulant incorporer les virus des insectes dans la classification générale des virus, qui a été proposée par le Comité International de la nomenclature de virus. (Lwoff et Tournier, 1966). On doit reconnaître cependant, que malgré le nombre élevé de virus d'insectes connus, les données fragmentaires que nous possédons au sujet de la plupart d'entre eux, ne permettent pas, pour l'immédiat, la réalisation de ce projet. Ainsi, il est encore admis que les virus d'insectes puissent être divisés, dans une classification à part, en virus à corps d'inclusion et en virus sans corps d'inclusion (Bergold, 1964 et Smith, 1967).

Le premier groupe est constitué par des virus de symétrie hélicoïdale ou cubique, incorporés dans une protéine qui prend la forme d'un polyèdre, granule, croissant, etc., d'où provient le nom des types de maladies telles les polyédroses, granuloses, etc. Leur formation est observée dans le noyau ou dans le cytoplasme, d'où proviennent les dénominations de polyédroses nucléaires ou cytoplasmiques.

Le deuxième groupe est formé par des virus à symétrie cubique ou hélicoïdale qui ne provoquent pas, durant leur réplication, l'apparition de corps d'inclusion. Il s'agit de virus

libres ou sans corps d'inclusion, qui apparemment sont moins nombreux en comparaison avec ceux du premier groupe.

Nous présentons ci-dessous, une brève énumération de ces virus, ainsi qu'un aperçu de leur réplication et de leur structure observées au microscope électronique par différents auteurs.

CHAPITRE 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE DE LA RÉPLICATION
ET DE LA MORPHOLOGIE DES VIRUS D'INSECTES
EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE.

a- VIRUS A CORPS D'INCLUSION

Polyédries nucléaires (Borrelinavirus)

Les premières micrographies réalisées en microscopie électronique, de virus isolés de polyèdres, ont été publiées par Bergold (1947) et par Bergold et Friedrich-Frekka (1947). Elles avaient pour objet la polyédrie nucléaire de *B. mori*, *L. dispar* et *L. monacha*. Ces images effectuées sans le concours de la méthode d'ombrage métallique mise au point par Williams et Wyckoff (1946), n'en montrent pas moins l'image de virus en forme de bâtonnet, que l'amélioration des techniques de préparation devait bientôt faire voir en toute précision. Ces premiers travaux de Bergold permirent de déterminer les formes et les dimensions de ces particules virales, précisant ainsi les données qu'avait apportées le microscope photonique (Komarek et Breindl, 1924; Paillot et Gratia, 1939). Les études subséquentes en microscopie électronique révélèrent les diverses formes géométriques que pouvaient prendre les polyèdres.

D'autres études sur les polyédroses nucléaires, permirent le dénombrement des particules virales incluses dans un réseau cristallin de molécules protéiques, et l'observation de coupes fines, obtenues à partir de ces polyèdres révéla la distribution et l'architecture du cristal (Bergold 1963). Quant aux travaux concernant le développement du virus de la polyédrie nucléaire, ils furent accomplis notamment par Vago et al. (1955), Adams et Wilcox (1966).

En plus des premiers chercheurs déjà mentionnés, Smith (1951), Steinhaus (1953), Xeros (1953), Bird (1964), Heimpel et Adams (1966), Adams et al. (1968) ont, parmi d'autres, marqué par leurs travaux nos connaissances actuelles de la morphologie et de l'ultrastructure de la polyédrie nucléaire, particulièrement au niveau de la microscopie électronique. Leurs nombreuses publications ont donné les piliers sur lesquels les études complémentaires pourront s'édifier.

De ces études, il s'avère que les virus des polyédries nucléaires sont des virus à ADN, de symétrie hélicoïdale, dont le virion enveloppé, en forme de bâtonnet, peut mesurer de 20 à 70 m μ de largeur sur 200 à 400 m μ de longueur. Les virions se répliquent séparément, puis ils sont incorporés dans le réseau cristallin de molécules protéiques solidement liées les unes aux autres. Ce réseau est appelé polyèdre ou corps d'inclusion. Le diamètre des

polyèdres peut varier de 0.5 à 15 μ . Le polyèdre, en général, incorpore plusieurs virions quelquefois séparés, quelquefois réunis par groupes en formation de faisceaux.

Parmi les polyédries nucléaires les mieux connues, il faut citer celles de *Bombyx mori* qui a fait l'objet de plusieurs études au microscope électronique.

Polyédries cytoplasmiques (Smithiavirus)

Smith et Wyckoff (1950) ont observé au microscope électronique chez *Arctia caja* Linn., une forme virale différente de celles alors connues chez les polyédroses nucléaires. Ce nouveau virus d'insectes était également contenu dans un polyèdre, mais de nature cristalline différente. Elle avait déjà été observée dans le cytoplasme des cellules d'invertébrés, mais sans autre différenciation que le site d'infection (Ishimori, 1934, Lotmar, 1941) cette nouvelle virose a été désignée par Xeros (1952) sous son nom actuel de polyédrose cytoplasmique. Les paramètres influençant le développement de ce virus ont été étudiés par Kurstak (1967) chez *Mamestra brassicae* L.

Vago et al. (1959) furent les premiers à étudier en haute résolution le processus d'infection et la réplication de cette polyédrie cytoplasmique chez les Lépidoptères. La même année, Smith et Hills (1959) montrèrent la nucléocapside de ce virus dissociable de l'enveloppe protéique. Dès 1963, 58 de ces virus étaient déjà décrits à Cambridge (Angleterre) (Smith 1967).

Les travaux d'Aruga et Israngkul (1961) sur la morphologie des polyédroses cytoplasmiques de *Bombyx mori* L., ont permis de connaître deux formes différentes de ces virus, et de soupçonner que d'autres aspects restent possibles. Plusieurs subdivisions pourront, sans doute, s'ajouter au fur et à mesure des nouvelles observations.

L'ultrastructure de ce virus de la polyédrie cytoplasmique du Lépidoptère *Bombyx mori* L., a été mise à jour d'une façon très détaillée par Hosaka et Aizawa (1964). Arnott et al. (1968) ont publié le cycle de réplication ainsi que l'ultrastructure de la polyédrose cytoplasmique chez un autre Lépidoptère, *Danaus plexippus*.

Ces études nous permettent de savoir qu'il s'agit de virus à ARN, de symétrie cubique, avec ou sans enveloppe, dont les virions ne semblent pas avoir plus de 70 m μ

de diamètre. Le polyèdre de 0.5 à 3 μ incorpore ces virions progressivement en se donnant lui-même une forme géométrique définie qui est codée par le génome viral.

Une des polyédroses cytoplasmiques les mieux étudiées semble être celle du Lépidoptère *Antheraea pernyi*.

Granuloses (Bergoldiavirus)

Identifié sur *Pieris brassicae* L. par Paillot (1926) qui nomma cette maladie "pseudo-grasserie", le virus de la granulose a fait l'objet de nombreuses études morphologiques et de réplication. Entouré d'une capsule ovo-cylindrique, ce virus est en forme de bâtonnet. Les particules capsulaires donnent une image de granules, située à l'extrémité des possibilités de l'optique de verre. Vu par Bergold (1948) pour la première fois au microscope électronique, chez *Choristoneura murinana* Hbn., ce virus a fait l'objet d'une revue de question par Huger (1963). Il a été étudié en détail notamment par Smith et Hills (1960) et Bird (1963) grâce à l'utilisation de la coloration négative au phosphotungstate en microscopie électronique. La structure en hélice, semblable à celle du virus de la mosaïque du tabac, se retrouve chez la particule virale ainsi que sur l'enveloppe interne qui la recouvre. Celle-ci prend cette texture par moulage ou réplique du virion qu'elle contient. Cette première membrane interne est elle-même recouverte d'une paroi externe. L'ensemble de la capsule mesure de 300 à 511 m μ par 119-350 m μ (Huger 1963).

Vago et al. (1955) ont été les pionniers de l'étude de la réplication de ce virus au microscope électronique. Ils ont démontré chez *Pieris brassicae* L. le site nucléaire de développement du virus de la granulose, et ces travaux ont été suivis par ceux de Tanada (1956) et ceux de Bird (1964) sur les mensurations de la particule virale.

Un virus de la granulose a été récemment décrit chez *Plodia interpunctella* Hbn. (Arnott et Smith 1968) quant à son ultrastructure et à sa réplication. Ce virus se présente en forme de bâtonnet recouvert de deux membranes, et encapsulé dans un cristal protéique au stade du virion. Il mesure 210-260 m μ X 30-39 m μ .

Maladies à fuseaux (Vagoiavirus, Pox-like virus)

Hurpin et Vago (1963) découvrirent un virus à inclusion cristalline responsable des

maladies à fuseaux, et différent des autres virus d'insectes (Amargier et al. 1964). Il serait apparenté aux virus d'invertébrés (Smith 1967). Ce virus a été isolé à l'origine chez le Coléoptère *Melolontha melolontha* L. Une étude en coloration négative par Vago et Croissant (1964) montra la forme ovoïde de ce virus.

Weiser (1965) publia ses observations sur un autre Vagoiavirus mais isolé cette fois d'*Acrobasis* sp. L. Les caractéristiques de ce virus sont similaires à celles de l'agent causal des maladies à fuseaux décrites chez *Melolontha melolontha* L. (Smith 1967).

Les publications subséquentes de Vago et al. (1968) et de Bergoin et al. (1968), faites cette fois sur l'ultrastructure de ce virus à ADN, indiquent qu'il s'agit de particules virales ovoïdes de très grande taille (250 x 350 mμ).

Roberts et Granados (1968) ont classifié parmi les Vagoiavirus, un nouveau virus isolé chez *Amsacta moorei*. Ce virus ne produit toutefois pas les fuseaux protéiques propres aux Vagoiavirus. Les corps d'inclusion présentent une forme ovoïde, et le site de réplication se situe au niveau du cytoplasme des cellules adipeuses.

Leurs études en microscopie électronique sur des coupes fines, révèlent la présence d'une particule virale par cristal, ainsi que des formes virales immatures que ces auteurs apparentent à celles des "Pox Virus". Les dimensions de ce virus sont identiques à celle des Vagoiavirus.

b- VIRUS SANS CORPS D'INCLUSION (MORATORVIRUS)

Virus irisants

T I V (*Tipula* Iridescent Virus) – (Virus irisant de *Tipula*)

Le virus irisant du Diptère *Tipula paludosa* Meig. décrit par Xeros (1954), a été, pour la virologie en général, le premier virus dont la morphologie a été étudiée d'une façon élaborée au microscope électronique. Ce travail a été fait par Williams et Smith (1958), mais sans l'aide des colorations négatives. Cette étude a servi à de nombreux autres travaux de géométrie virale, comme référence de travail. La forme icosaédrique de cette particule virale a été démontrée en analogie avec des modèles de grande échelle dont l'ombre projetée a été comparée avantageusement avec les techniques d'évaporation métallique de Williams et Wyckoff (1946). Smith et Hills (1959) ont

complété ces images en trois dimensions par l'utilisation de la coloration négative, où la forme hexagonale est clairement représentée, ainsi que la double membrane et les différentes opacités aux électrons des diverses particules virales. Ces derniers auteurs décrivent le TIV comme une particule icosaédrique possédant 812 capsomères (Smith et Hills 1962).

Bird (1962) utilisa la microscopie électronique pour l'étude de la réplication de ce virus, qui se fait au niveau du cytoplasme, et les travaux de Thomas et Williams (1961), en haute résolution, sur la localisation de l'ADN et des protéines de TIV, complètent les premières données morphologiques, par l'utilisation des digestions enzymatiques, introduisant ainsi l'histochemie au niveau ultrastructural des virus d'invertébrés.

S I V (*Sericesthis* Iridescent Virus) – (Virus irisant de *Sericesthis*)

La morphologie du virus irisant, isolé de *Sericesthis pruinosa* Dalm. (Coléoptère) et étudié sur le Lépidoptère *Galleria mellonella* L., ressemble au TIV (Steinhaus et Leutenegger 1963). Day et Mercer (1964) en ont décrit les caractéristiques, semblables au TIV. Cette comparaison a été également faite par Smith (1967). Cependant, la récente étude de l'ultrastructure de ce virus, faite par Bellet (1968), indiquerait que ce virus icosaédrique serait composé de 1112 capsomères au lieu de 812 dans le cas de TIV.

Leutenegger (1964) a étudié la réplication du SIV chez *Galleria mellonella* L. Elle serait comparable à celle du TIV à l'exception de la sélection des tissus infectés. La multiplication virale se fait également dans le cytoplasme. Les premières particules virales, encore incomplètes, apparaissent après six heures d'infection, et sont entourées d'une vésicule. On retrouve les formes complétées du virion après 48 heures. Après 5 jours, le cytoplasme est entièrement remplacé par les virions.

M I V (Mosquito Iridescent Virus) – (Virus irisant du moustique)

Cet autre virus irisant a été étudié chez le Diptère *Aedes taeniorhynchus* Wied. par Clark et al. en 1965. Ses caractéristiques se rapprochent également du TIV.

La paralysie de l'abeille

La paralysie de l'abeille dont l'agent viral avait été reconnu par Burnside (1945), a été réétudiée par Bailey et al. (1963). Ces derniers auteurs ont reconnu deux virus différents, causant deux paralysies distinctes.

ABPV (Virus de la paralysie aiguë de l'abeille)

Isolé, et étudié au microscope électronique par Bailey et Gibbs (1964), le virus de la paralysie aiguë mesure 28 mμ de diamètre et présente des formes denses et transparentes aux électrons.

CBPV (Virus de la paralysie chronique de l'abeille)

Reconnu et étudié au même moment que l'ABPV par Bailey et al. (1963), ce virus possède une morphologie différente. Ses formes irrégulières mesurent environ 27 x 45 mμ et sa réplication se fait dans le cytoplasme.

SBV (Sacbrood)

Mises en évidence par White (1917) puis par Steinhaus (1949) chez *Apis mellifera* L. ces particules virales du Sacbrood ont été observées en coloration négative par Bailey et al. (1964), et par Breck et Kralik (1965) qui semblent avoir été les premiers à utiliser les techniques de rotation de Markham et al. (1963) dans l'étude de virus d'invertébrés. Ces auteurs ont établi la symétrie axiale de ce virus comme étant 5:3:2, et le nombre de capsomères périphériques à 12. Leurs micrographies électroniques originales montrent 3 capsomères sur le côté d'un triangle de l'icosaèdre, ce qui donne une somme de 42 pour le nombre total de capsomères. Le diamètre de cette particule est établi à 28 mμ en coloration négative et à 30 mμ après ombrage.

Le virus Sigma de la Drosophile (Virus héréditaire)

L'effet du gaz carbonique sur les hôtes infectés du virus Sigma de la Drosophile est bien connu (L'Héritier, 1948, 1958). Nommé également virus héréditaire, à cause de son mode particulier d'infection transovarienne naturelle (Smith, 1967), ce virus n'a fait que tout récemment le sujet d'études morphologiques.

Berkaloff et al. (1965) ont étudié, au microscope électronique, les cystes ovariens de *Drosophiles* stabilisées, c'est-à-dire celles toujours infectées héréditairement et sensibles au gaz carbonique. Ils ont observé que les particules virales se présentaient sous forme de doigt de gant, tant en coloration négative sur des virions isolés de broyats, qu'en coloration positive lors d'inclusions virales étudiées sur coupes fines. Ces particules mesurent environ 80 m μ X 150 m μ .

Récemment, Teninges (1968) confirmait l'ultrastructure du virus sigma observé dans les cellules germinales mâles de *Drosophiles*. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus par Berkaloff et al. (1965) qui utilisèrent les ovaires de femelles stabilisées. Teninges précise que les virions possèdent une double paroi ainsi que des striations transversales. Leur diamètre est de 70 m μ X 180 m μ . Toutefois des virions de taille supérieure ou inférieure ont également été observés.

La forme et la taille du virus sigma de la *Drosophile* correspondent à celles des virus de la stomatite vésiculeuse et de la rage. On doit noter la ressemblance morphologique de ces trois virus.

Le virus de la denonucléose (VDN)

Meynadier et al. (1964) publiaient leurs observations sur un nouveau virus d'insecte, nommé virus de la denonucléose, étant données l'hypertrophie et la formation d'une masse dense intranucléaire dans les cellules infectées par ce virus. Lors de quelques travaux subséquents publiés par différents auteurs (Amargier et al., 1965, 1966; Longworth et al., 1968; Truffaut et al., 1967; Vago et al., 1964, 1966) l'origine virale de cette nouvelle maladie et la nature de l'acide nucléique ont été étudiées.

Ces recherches ont été poursuivies par Kurstak et ses collaborateurs durant les dernières années, et cette équipe a mis à jour la nature polytrophe du VDN, sa morphologie et ses caractéristiques immunologiques. (Kurstak et Vago, 1967; Kurstak et al., 1967; Garzon et Kurstak, 1968; Kurstak et Stanislawski-Birencwajg, 1968; Kurstak et al., 1968, a,b,c,d; Kurstak et Côté, 1968, a,b; Kurstak et Côté, 1969).

Le virus de la denonucléose, d'après les travaux réalisés récemment (Kurstak et al., 1967), semble se rapprocher des virus des vertébrés. Si les aspects histopathologiques, histochimiques

et immunologiques ont été spécialement considérés, les données concernant la réplication et la morphologie de ce virus nous ont semblé particulièrement incomplètes. Ces dernières préoccupations nous ont vivement intéressé, et nous étudierons, au cours de ce travail, les lésions cellulaires causées par ce virus, son mode de réplication et sa morphologie. Les résultats exposés permettront une proposition de classification de ce virus dans un système reconnu.

Plusieurs techniques ont été utilisées lors de cette étude, et nous en exposerons d'abord, les avantages et les inconvénients au chapitre II avant d'en développer la méthodologie au chapitre III

<i>Principales caractéristiques de certains virus d'invertébrés</i>								
Virus	Corps d'inclusion	Acide nucléique	Poids moléculaire en millions/Dalton	Forme de la particule	Site de réplication	Dimensions Å	Diam. de l'hélice ou nombre de capsom.	Hôte d'origine
Polyédrie nucléaire	+	ADN	1.8-2.2	Hélicoïdale	Nucl.	200-500 X 2000-4000	200-700 Å	Lépidoptère Diptère Hyménoptère
Polyédrie cytoplasmique	+	ARN		Cubique	Cyto.	600-700	12	Lépidoptère
Granulose	+	ADN		Hélicoïdale	Nucl.	620X4110	360-850 Å	Lépidoptère
Maladies à fuseaux	+	ADN		Hélicoïdale	Cyto.	2500X4500		Coléoptère
Irisant TIV	-	ADN	126	Cubique	Cyto.	1300	812	Diptère
Irisant SIV	-	ADN	134	Cubique	Cyto.	1300	1112	Coléoptère
Irisant MIV	-			Cubique	Cyto.	1800		Diptère
Paralysie aiguë de l'abeille	-	ARN		Cubique	Cyto.	280		Hyménoptère
Paralysie chronique de l'abeille	-	ARN			Cyto.	270X450		Hyménoptère
Sacbrood	-	ARN		Cubique	Cyto.	280X300		Hyménoptère
Sigma de la Drosophile	-	ARN		Hélicoïdale	Cyto.	700X1400		Diptère
Densonucléose	-	ADN	3	Cubique	Nucl.	200	42	Lépidoptère

(Aizawa et Jida, 1963; Bellet et Inman, 1967; Faulkner, 1964; Kawase, 1967; Lee et Furgala, 1965; Onodera et al., 1965; Tarasevitch, 1946; Truffaut et al., 1967; Vago, 1968.)

CHAPITRE II

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE DES PRINCIPALES MÉTHODES UTILISÉES DANS L'ÉTUDE DES VIRUS

a- ÉTUDE DE LA RÉPLICATION VIRALE

Techniques histopathologiques

L'histopathologie est après la symptomatologie, la plus ancienne méthode de détection et d'étude des lésions virales. Perfectionnée lors des derniers siècles, parallèlement à l'évolution du microscope, cette discipline scientifique demeure le guide et la base des autres moyens mis à la disposition de la recherche biologique. Appliquée depuis plus d'un siècle à l'étude des virus d'invertébrés, elle est à l'origine de nos connaissances actuelles de la réplication virale.

La détection des polyédroses nucléaires et cytoplasmiques, et celle des granulosés, est à la portée du microscope photonique, les corps d'inclusions de ces viroses mesurant généralement entre 0.5 et 15 microns (Smith, 1963).

Le processus de réalisation des préparations histopathologiques, qui semblait définitivement établi, a été modifié par l'introduction des nouveaux cryotomes qui permettent l'obtention de coupes minces de 1 à 5 microns (Pearse, 1968), permettant ainsi un diagnostic rapide et précis des altérations morphologiques causées par l'infection virale.

L'histochemie s'est implantée comme un raffinement et une spécialisation de l'histologie. Faites sur coupes ou sur frottis, les observations de cellules infectées ont permis de voir les différents modes de réplication virale: virus intégrés à la cellule génétiquement, virus cytotocidal menant à la destruction de la cellule hôte ou réplication modérée au sein des cellules, produisant des désordres passagers ou chroniques.

Culture des tissus

Enders et al., (1949) reprirent les techniques de culture de tissus et les utilisèrent lors de leurs études du virus de la poliomyélite. Ils en firent un des méthodes les plus pratiques données à la technologie virale.

Le feuillet cellulaire obtenu de tissus trypsinisés, représente une surface biologique de choix et de grande sensibilité en vue du développement viral. Les effets cytopathogènes peuvent être décelés à l'oeil nu, dans le cas de plages, et la gamme de grossissements utilisée dans l'observation microscopique des cellules altérées, offre autant d'étapes d'observation du tableau des effets de l'infection produite.

La production de grandes quantités de virus est aussi rendue possible par la culture de virus sur des cellules en suspension dans le milieu de culture.

Chez les invertébrés, bien que les premiers essais de culture de virus datent de 1935 (Trager, 1935), cette méthode pose toutefois de nombreux problèmes encore irrésolus. Ainsi, les diverses familles d'insectes sont très éloignées les unes des autres tant par leur physiologie que par leur philogénétique. De nombreux milieux de culture de composition variée et différente de ceux utilisés pour les cellules de mammifères, doivent être préparés. De plus, les différentes cellules aptes à être cultivées semblent être fort restreintes.

Gaulden et Carlson (1951), Wyatt (1956), Vago et Chastang (1958), Vago (1959), Aizawa et Vago (1959), Grace (1962), Martignoni (1962), Vaughn et Faulkner (1963), ont étudié systématiquement la culture de virus sur des cellules d'invertébrés "in vitro". L'ensemble des connaissances actuelles sur ce sujet a été résumé par Vago (1967) et a donné lieu à deux colloques internationaux (Vago, 1962; Barigozzi, 1968).

Techniques histochimiques

Détection de l'ADN ou de l'ARN viral par les fluorochromes

En 1956, Armstrong publia ses résultats sur les propriétés de différenciation des acides nucléiques par les fluorochromes. Depuis ce temps, l'orangé d'acridine spécialement, est utilisé intensivement dans l'analyse de l'acide nucléique viral. Les raffinements apportés depuis lors à cette technique, ont permis de reconnaître non seulement l'ADN ou l'ARN mais également la configuration spatiale des acides nucléiques. Les services que rend cette technique spécifique et précise sont devenus routiniers.

Après la digestion enzymatique des protéines de surface des particules virales, on procède à la coloration à l'orangé d'acridine dont l'acidité et la concentration détermineront l'interprétation des résultats. A pH 4.0 et à une concentration d'orangé d'acridine de 0.01%, la coloration de frottis cytologiques fixés au Carnoy, donne les résultats suivants (Mayor 1962):

Acide nucléique viral	Fluorescence	ADNase	ARNase	Utilisation d'enzymes protéolitiques
ADN bicaténaire (animal)	Jaune-vert	+	-	+
ADN bicaténaire (phage)	Jaune-vert	+	-	-
ARN	Rouge	-	+	-
ARN monocaténaire (phage)	Rouge	+	-	-

L'utilisation des fluorochromes en vue de l'étude de la réplication virale, a fait le sujet d'un travail de Mayor (1961), où il effectua la comparaison entre l'étude par des colorations cytologiques, l'étude des phénomènes biologiques et la fluorescence par l'orangé d'acridine. Récemment, cette technique a été appliquée avec succès en virologie des invertébrés par Kurstak et al. (1968a).

Feulgen-Rossenbeck

Une nouvelle méthode pour l'identification de l'acide désoxyribonucléique est apparue en 1924 lors des travaux de Feulgen et Rosenbeck. Reposant sur la libération des groupements aldéhyques de la désoxypentose de l'ADN par une hydrolyse modérée, cette technique produit une coloration intense et spécifique au niveau de la chromatine nucléaire. A l'exception du fixateur de Bouin causant une hydrolyse excessive, la réaction de Feulgen donne de bons résultats après la plupart des fixations (Lison, 1960).

La réaction de Feulgen et Rosenbeck (1924) demeure une des meilleures confirmations de la nature de l'acide nucléique des cellules ou des virus en présence (Pearse, 1968). Reposant sur la coloration par le réactif de Schiff (formé de fuchsine basique et d'acide sulfurique) de l'acide apurinique débarrassé de ses bases puriques par hydrolyse, elle donne dans le cas de l'acide désoxyribonucléique une coloration pourpre accentuée.

La spécificité de cette réaction qui a fait de nombreux débats dans le passé, est très précise (Lison, 1960, Pearse, 1968), et peut être vérifiée par la réaction de Feulgen sur des éléments non hydrolysés, alors que la réaction doit demeurer négative.

Digestions enzymatiques ARNase

La méthode confirmant la présence d'ARN mise au point par Brachet (1940), est contrairement à la technique de Feulgen pour l'ADN, un test négatif. On se débarrasse d'abord du produit qui nous intéresse pour en prouver sa présence. Cette méthode repose sur la dégradation de l'acide ribonucléique par la ribonucléase afin de la rendre soluble et dialysable. La coloration par les colorants basiques devient ainsi irréalisable. La spécificité de cette réaction est excellente (Lison, 1960, Pearse, 1968), et les quelques exceptions à la règle sont bien connues.

Digestions enzymatiques ADNase

La confirmation de la présence d'ADN peut être également faite par l'attaque enzymatique spécifique réalisée par l'ADNase (Epstein, 1958).

Les travaux de Epstein et Holt (1958) sur le virus de Rous et ceux de Bernhard et Tournier (1962) sur de nombreuses cellules infectées, marquent les débuts d'une technique qui a été largement utilisée. Elle a été également appliquée à la virologie des invertébrés (Kurstak et al., 1968 b).

Techniques immunochimiques

Double diffusion en plaque d'Ouchterlony

La méthode d'Ouchterlony (1949 a) consistant à produire une diffusion simultanée des antigènes et des anticorps à travers une couche de gélose, découle directement de la réaction de précipitation produite entre un antigène soluble et son immunosérum spécifique. L'étude des lignes de précipitation produites par la rencontre d'un immunosérum placé dans un puits central creusé dans la gélose, et des antigènes déposés dans des puits périphériques, nous permet de connaître la relation entre un mélange d'antigènes et un immunosérum comportant plusieurs des anticorps correspondants.

Fayet et al., (1957), Mansi (1957), Le Bouvier (1957) ont entre autres, utilisé cette méthode lors de l'étude d'antigènes viraux.

Immunoélectrophorèse

Grabar et Williams (1953), Grabar (1957, 1960) ont réalisé sur une même plaque de gélose la double diffusion bidimensionnelle telle que rendue possible par la technique d'Ouchterlony (1949 a et b, 1953), et la séparation électrophorétique d'un mélange de protéines antigéniques. Les protéines possèdent la propriété de migrer dans un champ électrique et la méthode de l'électrophorèse permet de visualiser les différences de mobilité entre des protéines de nature diverse. Les virus, grâce à leur surface protéique, possèdent les mêmes avantages vis-à-vis de l'électrophorèse.

Cette méthode d'immunoélectrophorèse a été appliquée à la virologie par Fayet et Poncet (1958), Gendon (1958), Leers et al. (1968), pour l'inventaire d'antigènes viraux.

Conjugaison d'anticorps aux fluorochromes

Depuis son introduction dans la technologie moderne (Coons et al., 1941), la technique utilisant les anticorps fluorescents a été développée en plusieurs ramifications, histologiques, virologiques, etc. Elle a donné naissance à d'autres méthodes de recherche et de contrôle comme celle de la conjugaison à la ferritine (Singer et Schick, 1961), ou aux enzymes (Nakane et Pierce, 1967, Leduc et al., 1968). Les possibilités de ces méthodes relèvent du fait qu'une protéine-anticorps conserve ses propriétés immunologiques lorsqu'elle est conjuguée avec des colorants (Reiner, 1930) ou certains autres marqueurs.

Coons et al. (1941) étudièrent le mode de conjugaison des anticorps avec plusieurs colorants fluorescents et mirent au point cette technique utilisée maintenant universellement pour la localisation des sites antigéniques.

Dans la méthode utilisée actuellement, on se sert de l'antiglobuline fluorescente pour la détection des anticorps spécifiques liés aux antigènes. Ces anticorps agissent aussi comme antigènes envers l'antiglobuline et comme anticorps vis-à-vis de l'antigène présent sur, ou dans la cellule infectée. Afin d'obtenir des résultats valables, plusieurs points doivent être retenus, dont les réactions non-spécifiques dues à l'altération des sites possibles de réaction et l'exactitude du processus de conjugaison.

Lorsque bien réalisée, la technique d'immunofluorescence est de grande valeur en virologie. Elle permet de suivre l'évolution de la réplication virale au sein des cellules, en localisant le matériel antigénique viral. Sa sensibilité est très prononcée, elle peut aller jusqu'à la détection de groupes d'une cinquantaine de particules virales dans le cas du virus de la poliomyélite (Mayor et Divan, 1961).

Conjugaison d'anticorps à la ferritine

La transposition des techniques d'immunofluorescence à la microscopie électronique a été faite par Singer (1959). La ferritine est une des molécules denses aux électrons qui peuvent être substituées à la fluorescéine ou à d'autres fluorochromes, et sa taille permet d'obtenir une grande résolution des sites antigéniques. Tout comme les colorants, elle peut se conjuguer aux anticorps sans les altérer. Le mercure, l'iode ou l'uranium peuvent lui être substitués (Glauert, 1965)

Constituée à 20% de fer, (hydroxyde-phosphate ferreux) la molécule de ferritine possède une enveloppe protéique, l'apoferritine, d'un diamètre de 110 Å recouvrant les micelles d'hydroxyde ferreux tétraédriques de 55 Å de diamètre (Carasso N. et al., 1961). La conjugaison est habituellement effectuée par le méta-xylylène diisocyanate.

L'application en virologie de cette technique a été faite sur le virus de la vaccine par Morgan et al., (1961) et par Singer et Schick (1961), sur le virus de la mosaïque du tabac TMV. Pour le TMV, Singer et Schick (1961) ajoutèrent le virus au conjugué de ferritine-anticorps. L'examen au microscope électronique montra que la ferritine conjuguée s'était attachée sur le TMV spécifiquement.

Conjugaison d'anticorps aux enzymes

Les premières expériences de conjugaison d'un enzyme à un anticorps ont été entreprises par Ram et al., (1966). Cette même année, Graham et Karnovsky (1966) ainsi que Avrameas et Uriel (1966) ont repris et perfectionné cette méthode de marquage qui présente un grand intérêt étant donné qu'elle s'applique tout aussi bien aux examens en microscopie photonique qu'en microscopie électronique (Nakane et Pierce, 1967).

De plus, la pénétration de l'anticorps couplé à la peroxydase, par exemple, est de quatre fois supérieure à l'anticorps couplé à la ferritine (Bouteille et Avrameas, 1967). D'autres enzymes peuvent être tout aussi avantageusement utilisés, telle la phosphatase alcaline (Scott et al., 1968).

La séquence de la réplication virale peut être suivie avec grande précision en microscopie électronique grâce à cette méthode de marquage des anticorps aux enzymes. Les sites antigéniques sont ensuite mis en évidence cytochimiquement par les techniques habituelles (Graham et Karnovsky, 1966).

Autoradiographie

Les isotopes radioactifs s'adaptent particulièrement à de nombreux aspects de la virologie. La composition du virus, le site de synthèse et de réplication peuvent être suivis par cette méthode. (Granboulan et Tournier, 1965). Si les virus purifiés peuvent être marqués en dehors des cellules hôtes, l'incorporation naturelle de composés marqués lors de la synthèse virale "in situ", semble davantage intéressante.

Ce marquage présente toutefois quelques difficultés, spécialement dans le cas de petits virus à cause d'une part, de leurs propriétés moindres de regroupement et d'autre part, de la quantité réduite de matériel qu'ils représentent. De plus, dans le cas de travaux sur l'acide nucléique, seulement la moitié du précurseur radioactif peut être retrouvée après 4 heures d'inoculation (Salzmann et Sebring, 1961), et l'acide nucléique est reformé de novo (Lieberman et Ove, 1960). Le blocage de la synthèse par la fluorodéoxyuridine (FUBR), par exemple, dans le cas de l'ADN viral, faciliterait l'incorporation plus prononcée des marqueurs radioactifs.

L'incorporation de ces éléments radioactifs étant faite, non après la mise en coupes ou en frottis du matériel infecté, mais lors de l'infection des cellules, cette méthode représente par le fait-même, un intérêt particulier. Intégrée au métabolisme de la cellule par son incorporation aux acides aminés ou à d'autres éléments essentiels, on peut suivre la course de la radioactivité tout au long du processus biologique concerné. Sa détection est habituellement faite quantitativement par un compteur à scintillation, et sa localisation, par l'autoradiographie. Cette dernière possède la propriété, grâce à son émulsion photographique d'être sensible aux rayons ionisants utilisés. La précision ou résolution de cette technique est actuellement meilleure qu'un dixième de micron (Rogers, 1967).

b — ÉTUDE DE L'ULTRASTRUCTURE VIRALE

Purification et concentration

Technique de "diagnostic"

Les techniques généralement utilisées pour la purification des virus en vue de leur examen au microscope électronique, peuvent se diviser en deux groupes, les méthodes rapides, et celles qui donnant un plus haut degré de purification, exigent un temps considérable et une technologie élaborée.

Les méthodes rapides, dites de diagnostic, utilisées en microscopie électronique, possèdent également l'avantage de nécessiter peu de matériel contenant présumément des virions. Elles permettent, comme dans le cas qui nous intéresse particulièrement, de détecter en quelques minutes la présence de virus chez les larves à un stage de développement où d'autres techniques demeureraient insensibles, ou exigeraient un délai considérable (Kurstak et Côté, 1968 b).

Mises au point par Almeida et Howatson (1962), Doane (1968), et Doane et al. (1968), ces techniques permettent de visualiser l'ensemble des particules virales provenant de cellules infectées.

Centrifugation

On peut par centrifugation, isoler les particules virales des autres éléments contenus dans la préparation infectée, à condition que ces diverses particules soient de densité différente.

Centrifugation préparative différentielle

L'utilisation, en alternance, de vitesses croissantes basses et élevées permet de préparer les éléments à être centrifugés ultérieurement de façon précise, en des groupes de densité semblable. Lorsque les constituants cellulaires sont de densité assez éloignée, ce mode de centrifugation est des plus pratiques. C'est ainsi que l'on peut dégrossir les échantillons cellulaires virosés.

Centrifugation en gradient de densité

La séparation d'éléments de densité différente mais rapprochée ne peut s'effectuer par la centrifugation différentielle. A ce niveau de préparation, la centrifugation en gradient de densité doit prendre la relève. Brakke (1967) a publié la revue complète du sujet.

La séparation en plusieurs zones, d'un ensemble de particules possédant entre elles peu de différence de gravité, est rendue possible par l'utilisation d'un gradient qui leur assure une stabilité accrue de sédimentation. On utilise le plus souvent le sucrose, les chlorures de césium et de rubidium ainsi que la glycérine.

Les coefficients de sédimentation ont été effectués pour la plupart des virus connus. Le premier coefficient fut fait par Lauffer (1944) sur le virus de la mosaïque du tabac (TMV).

Visualisation de l'ultrastructure

Géométrie virale

On peut dater les débuts des travaux sur la géométrie virale par les études en diffraction

aux rayons-X de Crick et Watson (1956). Leurs observations leur firent classer les virus en deux groupes géométriques: les formes à hélice et les formes cubiques. Ils démontrèrent que les formes cubiques seraient les suivantes: tétraèdres, octaèdres et icosaèdres. D'après ces auteurs, le contenu limité en acide nucléique de la particule virale ne permettrait pas la synthèse d'une variété de protéine. D'autre part, ils émettent l'hypothèse d'une enveloppe protéique composée de sous-unités réparties uniformément à la surface d'un noyau d'acide nucléique.

Williams et Smith (1957) montrèrent des images du virus irisant de *Tipula* (TIV) ombré à partir de deux angles différents. L'ombre ainsi obtenue révèle sa ressemblance avec celui produit par un modèle icosaédrique éclairé de manière similaire. L'utilisation des colorations négatives donnera plus tard des images claires de ces formes géométriques (Caspar et Klug, 1962), et leur interprétation sera faite par Caspar (1965, 1966).

Horne (1963), Almeida (1963), Markham et Hitchburn (1964), ont rapporté leurs observations sur différents virus étudiés spécialement par la coloration négative. Ces travaux forment la base actuelle de nos connaissances de la géométrie et de l'ultrastructure virales (Finch et Holmes, 1967).

Ombrage métallique

La première méthode, améliorant le contraste des échantillons biologiques examinés en microscopie électronique, fut imaginée par Williams et Wyckoff (1946). De plus, cette technique permettait de visualiser les trois dimensions de l'échantillon et d'en faire la mensuration. Cette méthode fut raffinée par Bradley (1954) qui obtint une meilleure résolution par l'emploi combiné du carbone et du platine. Hall (1956) l'adapta pour l'étude des macromolécules en se servant de l'intermédiaire des répliques-empreintes finement ombrées. Nonobstant ses limites de résolution et de fidélité, cette technique offre des images complémentaires fort intéressantes. L'évaporation métallique réalisée sur des échantillons en rotation a été appliquée d'une façon intensive par Kleinsmidt et al. (1961), prouvant ainsi sa grande utilité pour la visualisation de matériel aussi fin que les molécules étalées d'acide nucléique.

L'élimination des artéfacts de séchage par déshydration-congélation ou par la méthode du point critique (Anderson, 1956) ainsi que la recherche d'une moindre granularité du

métal évaporé, demeurent les limites de résolution et de fidélité de cette méthode.

Coloration négative

La coloration négative s'est avérée une technique simple et efficace. Depuis la mise au point de cette technique par Brenner et Horne (1959), nous pouvons visualiser par cette méthode les détails architecturaux des particules virales.

Valentine et Hopper (1957) avaient déjà donné les critères du contraste nécessaire à la visualisation de matériel particulaire. Le "remplissage" des interstices des composants particuliers par un "ciment ultra-fin" opaque aux électrons, permet d'une part, d'obtenir par rejet différentiel des électrons un contraste permettant la réalisation de l'image, et donne d'autre part, le support nécessaire aux constituants biologiques qui ne sauraient que s'effrondrer autrement lors du processus de déshydratation.

Les travaux de Huxley (1957) sur la mosaïque du tabac (TMV) avaient mis en évidence des détails de l'ordre de $40\text{\AA}$ grâce à la coloration négative réalisée au phosphotungstate. D'autres imprégnateurs, tels les sels de zirconium et d'uranium, améliorent sensiblement la résolution atteinte par Huxley quoique dans le cas des sels de zirconium le contraste des préparations ne soit pas toujours suffisant.

Une méthode d'interprétation des résultats obtenus par cette coloration a été publiée par Caspar (1966), et complétée par Finch et Holmes (1967).

Colorant négatif	Concentration	pH
Phosphotungstate de potassium	1-2 %	6.5-8.0
Tungstate de sodium	1-2 %	6.5-8.0
Molybdate d'ammonium	2-3 %	6.0-8.0
Acétate de lanthane	1-2 %	5.0-7.0
Acétate d'uranium	0.5-1%	4.5-7.2
Formate d'uranium	0.5-1%	4.5-5.2
d'après R.W. Horne (1967)		

Superposition périodique — rotation d'images particulières

Crick et Watson (1956) avaient décrit les virus comme des particules formées d'un noyau d'acide nucléique enveloppé par une capsid composée d'éléments symétriques. On pouvait s'attendre à ce que l'ensemble de la particule ainsi constituée prenne une forme géométrique, soit hélicoïdale, soit cubique.

Dans le cas de formes cubiques, la configuration géométrique exacte n'apparaît pas toujours fidèlement à cause des limites de contraste et de résolution de l'optique à notre disposition. L'examen de nombreuses images vues sous des angles différents, et l'amélioration du contraste des contours et des angles de ces images virales peuvent nous permettre de déterminer plus précisément la forme exacte qu'elles possèdent.

Markham et al. (1963) imaginèrent de faire pivoter sur son axe l'image d'une particule virale. Lors de la rotation d'un pentagone, par exemple, on peut obtenir une image identique à tous les 72 degrés. La superposition photographique de ces images permet d'obtenir un contraste accru où les détails d'une symétrie définie ressortent clairement.

Agrawal et al. (1965) ont étudié les risques d'artéfacts harmoniques inhérents à cette méthode.

CHAPITRE III

MATÉRIEL ET MÉTHODES

“Pour laver le mortier, on le saisit de la main gauche; avec les trois derniers doigts de la main droite on prend le pilon et l’on place le tout sous le siphon. L’index et le pouce de la main droite, restés libres, pressent la pince du siphon et l’eau s’écoule. Pendant ce temps, on agite le pilon dans le mortier pour en détacher tout le contenu que l’eau entraîne. . . Ces instructions pourraient être plus détaillées; mais elles sont suffisantes. En s’y conformant on parviendra facilement, avec un peu de persévérance, à opérer sans embarras. ” (lu le 2 avril 1808 à la Commission départementale de sériciculture du Gard par M. de Lachadenède.)

a — L'HÔTE

La souche

Nous avons utilisé tout au cours de ce travail, une même souche de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae). Les têtes de lignée de cette souche proviennent du "Research Institute", Belleville, Ontario, Canada.

Elevage

L'élevage de *Galleria mellonella* L. a été réalisé de façon aseptique dans des chambres stérilisées à l'ultra-violet et maintenues à 28°C et 32°C (Environmental Chamber, Labline Inc.). L'humidité et la température sont contrôlées automatiquement en vue d'une production maximale de larves saines.

Les colonies de larves reçoivent comme nourriture un milieu balancé composé de miel, de glycérine, de farine, de "Pablum" et de levure (Beck, 1960). Avant leur introduction dans les chambres d'élevage, ces aliments et leurs récipients (tubes de pyrex de 20 mm X 200 mm et de 50 mm X 200 mm) sont stérilisés à l'autoclave durant 15 minutes à une température de 110°C. (Fosset et Chastang, 1963). On laisse refroidir et on complète cette diète avec un composé vitaminé stérilisé par filtration sur membrane Millipore. Ensuite, on dépose aseptiquement sur ce milieu un nombre déterminé d'oeufs de *Galleria mellonella* (de 1 à 10 en général). Le chorion de ces oeufs est préalablement désinfecté par un traitement de 3 minutes dans une solution à 3% d'hypochlorite de sodium. Le cycle complet de développement de ce Lépidoptère est assuré dans les 45 à 60 jours.

b — L'AGENT INFECTIEUX

La souche

Le virus de la densonucléose (VDN) qui a servi lors de l'expérimentation, nous avait été fourni par le docteur E. Kurstak qui à l'origine avait obtenu ce virus de la Station de Recherches Cytopathologiques de St. Christol (France).

Entretien de la souche

Cette souche a été entretenue par infection naturelle et par infection expérimentale sur des larves de *Galleria mellonella* L.

L'infection contrôlée a été réalisée "per os" et par voie intrapéritonéale. Dans les deux cas, nous avons utilisé une microseringue de type "Manostat Digi-Pet" pouvant livrer soit 0.005 ml, soit 0.01 ml de suspension virale titrant $10^{-6,22} \text{DL}_{50}/\text{ml}$. L'infection "per os" a été faite directement dans l'oesophage des larves et l'infection par voie intrapéritonéale a été effectuée dans la cavité viscérale. Ces injections ainsi que le transport des larves sur le milieu nutritif, ont été réalisés aseptiquement.

Mode d'incubation

La température ambiante étant en relation directe avec le temps du développement de l'infection, nous avons choisi pour des raisons pratiques deux températures de travail, soit 32°C et 28°C.

Conservation des larves virosées

Les larves virosées sont sacrifiées et lyophilisées dans des fioles. Ces larves peuvent être conservées indéfiniment à -35°C.

Préparation en vue de l'infection

Les larves ainsi lyophilisées sont utilisées au fur et à mesure des besoins. Elles sont alors facilement broyées au mortier en présence d'un tampon phosphate (PBS) à pH 7.0. Les suspensions ainsi obtenues sont congelées et décongelées successivement trois fois et débarrassées des déchets par centrifugation. Le surnageant est ensuite purifié par ultracentrifugation différentielle à 3,000 g et à 12,000 g en gradient de densité pendant 15 minutes, et repurifié par filtration sur membranes "Millipore" de porosité décroissante (1.2 micron à 0.20 micron). Ainsi purifié, le VDN peut être conservé à -35°C ou à -70°C durant une période allant jusqu'à 3 mois tout en conservant un titre élevé d'infection ($10^{-6,22} \text{DL}_{50}/\text{ml}$) (Reed et Muench, 1938). Un culot contenant des particules virales suffisamment purifiées peut être obtenu en centrifugeant le surnageant à 90,000g pendant 60 minutes.

c — HISTOPATHOLOGIE

Fixation

Afin d'éviter les altérations cellulaires causées par le traumatisme dû à la dissection,

les larves ont été anesthésiées au chloroforme, sectionnées en gros fragments et plongées dans le fixateur pour une durée de 12 à 16 heures à la température de la pièce. Selon le mode de coloration choisi, diverses solutions de fixation ont été utilisées. Les échantillons destinées aux colorations à l'orangé d'acridine (Dart et Turner, 1959) ou à l'acri-flavine-Schiff (Culling et Vassar, 1961) ont été fixés au formol neutre à 10% (table III) ou au Carnoy (table II). Le fixateur de Helly (table I) a été utilisé en vue des colorations au Giemsa-érythrosine ou à la réaction de Feulgen (Kasten et Burton, 1959).

Déshydratation

Trois bains d'une durée totale de 12 heures, d'éthanol dilué (70%, 80%, 95%) et trois bains d'éthanol absolu nous ont semblé suffisant pour assurer une déshydratation complète à 4°C.

Eclaircissement

Les hydrocarbures habituellement employés en histologie comme intermédiaire entre l'alcool éthylique et la paraffine ont été éliminés, vu le durcissement trop accentué qu'ils provoquent chez les larves, et les difficultés de coupe ultérieures. Nous avons préféré l'alcool butylique parfaitement miscible à l'éthanol et à la paraffine, et qui possède de plus des propriétés avantageuses d'assouplissement de la chitine. Trois bains de butanol maintenu à 4°C et d'une durée totale de 24 heures procurent un éclaircissement complet.

Imprégnation

Nous avons utilisé pour l'imprégnation et l'enrobage une marque commerciale de paraffine préparée spécialement pour l'histologie (P.F. 52-54°C). Après 4 bains à une température de 56°C d'une durée de 6 heures chacun, le butanol nous a paru complètement éliminé, et les tissus bien imprégnés.

Enrobage

Les pièces ont été orientées et enrobées dans des moules spéciaux (Fisher Scientific) s'adaptant au microtome utilisé. Les blocs obtenus ont été refroidis rapidement afin d'obtenir une cristallisation fine de la paraffine.

Microtomie et montage

Des coupes de 4 et de 6 microns d'épaisseur, selon les besoins, ont été faites au microtome American Optical 820, puis étalées et collées aux lames selon les techniques habituelles.

Colorations

Les colorations ont été effectuées d'après les méthodes décrites dans les tableaux VI, VII, VIII et IX contenus dans l'appendice du présent travail.

d – DIGESTIONS ENZYMATIQUES

Fixation

En vue des digestions enzymatiques, nous avons utilisé une légère fixation au formol neutre (table I) maintenu à 4°C. Des fragments de larves saines et infectées ont été plongés dans ce fixateur durant une période allant de 8 à 12 heures selon la dimension des échantillons.

Obtention des coupes

Nous avons obtenu des coupes de 5 microns d'épaisseur à partir des tissus congelés et coupés au cryostat American Optical modèle 820C équipé d'un accessoire rapide de refroidissement au CO₂.

Traitement enzymatique

Nous avons d'abord traité les coupes obtenues dans une solution de pepsine à 0.02% (pH 2.0) durant 1 heure, à une température de 37°C.

Puis nous avons effectué la digestion pendant 24 heures à 37°C. dans une solution d'ADNase à 0.05 mg au ml de tampon maléate-tris 0.1 M à pH 6.5, à laquelle on ajoute 1.0 ml de MgSO₄ 7H₂O, 0.2 M. (Goring, 1968).

e — CONJUGAISON D'ANTICORPS ANTI-VDN

Obtention et contrôle des immunosérums

L'immunosérum spécifique en vue du couplage aux marqueurs, a été obtenu à partir de lapins immunisés par trois séries de deux injections intradermiques de VDN purifié, dont la première comprenait l'addition d'adjuvant de Freund. La précipitation des gamma-globulines a été effectuée au sulfate d'ammonium (Dixon et Web, 1964) et la dialyse faite contre 6 bains d'eau physiologique à pH 7.2 pour une durée totale de 72 heures. Nous avons contrôlé la spécificité des immunosérums par la méthode de double diffusion d'Ouchterlony réalisée en microtechnique.

Conjugaison à l'isothiocyanate de fluorescéine (ITFC)

Pour la conjugaison, nous avons choisi l'isothiocyanate de fluorescéine en tampon carbonate-bicarbonate qui est ajouté à l'immunosérum spécifique. Les gamma-globulines conjuguées sont séparées de l'excédent de fluorochrome sur colonne de séphadex G-25.

Examens microscopiques en fluorescence

Ces examens ont été effectués sur fond noir au microscope Leitz Orthoplan muni d'une lampe à vapeur de mercure à haute pression HBO, 200 watts. Nous nous sommes servis des filtres d'excitation BG12, 1.5 mm. d'épaisseur, UG1, 1 mm d'épaisseur, et des filtres d'arrêt K530 et K460 qui ont permis l'examen en lumière bleue et en ultra-violet.

Conjugaison à la peroxydase

La conjugaison anticorps anti-VDN à la peroxydase se prête particulièrement bien aux travaux sur *Galleria mellonella* L., étant donné que les cellules de larves de ce Lépidoptère ne révèlent aucune activité peroxydasique endogène décelable au microscope photonique (Kurstak et al., 1968 b). L'immunosérum spécifique est conjugué à la peroxydase de raifort selon la méthode décrite par Nakane et Pierce (1966), dans le cas de la microscopie photonique, et selon la méthode d'Avrameas et Bouteille (1968) dans le cas de la microscopie électronique (table XV).

Pour la microscopie photonique, l'immunosérum a été appliqué durant 15 minutes à 37°C sur des frottis d'hémolymphes fixés à l'alcool méthylique absolu, et sur des coupes

à 4 microns, fixées à l'alcool éthylique à 95%. Ces fixations ont été effectuées à 4°C.

g – AUTORADIOGRAPHIE

Marquage avec le précurseur radioactif

Nous avons utilisé comme précurseur radioactif, la thymidine tritiée. Ce produit nous a été fourni par les laboratoires Schwarz BioResearch Inc. (Orangeburg, New-York), sous leur numéro de catalogue 2532-95. Livré en solution aqueuse stérile, ce produit est obtenu par transformation enzymatique à partir de la thymine ^3H . Le marqueur est dépourvu de la portion désoxyribose de la molécule, rendant ainsi prépondérant le marquage au groupement méthyl. Le rendement actif de cette thymidine-méthyl- ^3H est approximativement de 3 Ci/mM.

Nous avons injecté intrapéritonéalement à des larves de 0.15 g. une dose de 5 μl et de 10 μl représentant 5 μCi et 10 uCi. La durée d'incorporation de la thymidine ^3H injectée a été de 2 heures, et nous avons utilisé des larves infectées depuis 2, 6, 8, 24 heures, 2 et 6 jours. Nous avons prélevé les glandes séricigènes et des fragments d'hypoderme qui ont été inclus puis coupés à l'ultramicrotome.

Autoradiogrammes

Pour l'autoradiographie, nous avons utilisé l'émulsion Ilford L_4 dilué au cinquième et couchée par la méthode de trempage des lames. Des coupes fines de couleur d'interférence jaune (650 Å) ont été étalées sur des lames de verre recouvertes de collodion. Chaque lame a reçu une coupe témoin et une coupe de matériel infecté au dessus de marques repères faites au diamant. L'exposition a duré 3 semaines à 4°C et nous avons développé ces préparations au révélateur D-19 de Kodak durant 5 minutes à 18°C (Grandboulan, 1966).

h – PURIFICATION ET CONCENTRATION DU VIRUS

Ultracentrifugation en gradient de densité en sucrose

Nous avons purifié le virus de la denso nucléose à partir de l'hémolymphe de larves infectées et placées depuis 4 jours à 32°C. L'hémolymphe recueillie (1 vol.) fut

additionnée de PBS (3 vol.) tamponné à pH 7.0. Cette suspension, après centrifugation (tête A-321, ultracentrifugeuse IEC, B-60, 4,000 g/10 minutes, 10,000 g/20 minutes, 90,000 g/60 minutes) donne un culot gélatineux contenant des particules virales pleines et vides (fig.39). Le culot repris dans du PBS a été centrifugé en gradient de densité de sucrose pendant 2 heures à 100,000g. (tête SB-283). Le gradient linéaire de sucrose (10% -60% p/v) a été préparé à l'aide de l'appareil Beckman. Nous avons utilisé le collecteur de fractions "Ultrorac" et "l'Uvicord" de LKB, pour la lecture des nucléoprotéines virales. Ces travaux ont été effectués à 4°C (Kurstak et al., 1968 d). Les fractions nucléoprotéiques après dialyse ont été examinées au microscope électronique.

i — MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE — COUPES FINES

Prélèvement

Le prélèvement des organes destinés aux coupes fines en vue de leur étude au microscope électronique, s'est fait à partir de larves anesthésiées, baignant dans le fixateur. Immédiatement après leur prélèvement, les pièces de tissus ont été recoupées et déposées dans la solution de fixation maintenue à 5°C.

Fixation

Une double fixation a été utilisée. Premièrement, les pièces ont été fixées durant 15 minutes à 5°C dans une solution de glutaraldéhyde à 5% en tampon Michaelis, pH 7.2 (table VIII). Deuxièmement, la postfixation a été faite à l'acide osmique (Palade, 1952) durant 1 heure à 5°C (table IX).

Déshydratation

Le choix du milieu d'enrobage a prescrit l'acétone comme agent déshydratant. Des bains d'une durée de 15 minutes chacun, à des concentrations d'acétone de 30 à 90%, et 2 bains d'acétone pur ont été utilisés en vue du milieu anhydre d'enrobage (table X).

Imprégnation et enrobage

Le Vestopal (Kellenberger et al., 1956, Kurtz, 1961) provenant de la firme Polysciences a été employé selon le processus établi par cette maison. La polymérisation des blocs "Beem" s'est faite à 60°C durant 24 heures, puis les préparations ont été laissées à

la température de la pièce durant 24 heures avant d'être coupées à l'ultramicrotome (table X).

Obtention de coupes fines

Après le retaillage de la pyramide, des coupes semi-fines en vue de la microscopie photonique, et des coupes ultra-fines en vue de la microscopie électronique, ont été obtenues sur l'Ultratome LKB III équipé de couteau de verre. Les coupes ont été recueillies sur un bac d'eau tri-distillée et montées sur grille de cuivre de 200 mailles par inch, non recouvertes de membrane-support.

Coloration des coupes fines

Nous avons utilisé une double coloration ou imprégnation à l'acétate d'uranium et au citrate de plomb de la façon suivante: acétate d'uranium à 5% en solution aqueuse durant 30 minutes (table XI), suivi d'une imprégnation au citrate de plomb durant 7 minutes (table XII).

Ces solutions ont été centrifugées et filtrées avant les colorations.

j – MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE – VIRUS PURIFIÉ

Montage et coloration négative des échantillons

Les particules virales purifiées ont été reprises en tampon acétate d'ammonium 0.1 M et additionnées, en partie égale, soit d'acide phosphotungstique à 2% (table XIII), soit de zirconium (table XIV), afin d'obtenir une coloration négative. Ce mélange a été déposé à l'aide d'un anneau de platine ou d'un vaporisateur (Backus et Williams, 1950), sur des grilles porte-objet recouvertes d'une membrane-support obtenue par trempage dans une solution de formvar à 0.25%. Ces membranes ont été renforcées par un dépôt de carbone (Bradley, 1954) rendu hydrophile soit par la condensation de vapeur d'eau, soit par évaporation du carbone en chambre ionisante.

Méthodes de diagnostic

Un échantillon broyé (organes) ou resuspendu (larves lyophilisées) ou dilué (hémolymphe) est déposé sur une surface hydrophobe près d'une goutte de phosphotungstate (table XIII). On produit un lien entre ces deux gouttes, et le matériel

particulaire passe vers la solution de colorant négatif, puis on prélève sur grille porte-objet.

L'autre méthode de diagnostic utilisée consiste à travailler à la surface d'une goutte d'eau déposée sur une surface hydrophobe. L'échantillon en suspension dans son tampon est déposé sur cette goutte d'eau et s'étale en surface. On le recueille sur porte-objet et on procède à la coloration négative.

Coloration négative

Nous avons utilisé trois sels lourds pour les "colorations" négatives, soit l'acétate d'uranium, le cacodylate de zirconium et le phosphotungstate de sodium. Le pH a varié de 6.0 à 7.4 et les concentrations ont été de 0.25% à 5%.

Ombrage des préparations

Afin de posséder des images complémentaires des particules isolées, des échantillons ont été ombrés au moyen de l'évaporateur Balzers Mikro. Deux techniques ont utilisées, soit l'évaporation d'un agglomérat de carbone-platine (Bradley, 1954), soit l'évaporation d'un fil de platine déposé en cavalier sur un filament de tungstène. Dans les deux cas, le métal lourd fut d'abord dégazé par chauffage sous vide, puis évaporé en atmosphère réduite, soit 10^{-5} mm Hg à une tension de 12 volts. Les échantillons ont été inclinés à 30° par rapport à la source d'évaporation.

Nous avons utilisé, pour les examens de particules virales en haute résolution, des membranes-support trouées (Huxley et Zubay, 1960). Dans ce cas, les échantillons sont déposés à l'anneau de platine et l'examen se limite aux particules retenues par les trous.

Préparation des membranes trouées		
Formvar	Glycerine	Diamètre maximum des trous en μ
8	1	25
16	1	14
32	1	7
120	1	4

d'après R.W. Horne (1967)

Superposition périodique des images particulières

Afin de pousser plus loin nos connaissances de la symétrie radiale de la particule virale étudiée, nous avons fait construire une platine rotative graduée, qui permet l'obtention de superposition périodique de particules virales tirées des micrographies électroniques (Markham et al., 1963, Agrawal et al., 1965). Ces particules ont été réagrandies photographiquement sur plaque-lanterne, contretypées et projetées à nouveau sur une émulsion fixée à la platine de l'appareil de rotation. Les 360° du cercle ont été divisés d'abord arbitrairement selon les superpositions possibles de diverses formes géométriques à symétrie variée, jusqu'à l'obtention d'images nettes superposables. Un modèle en grand format de la particule virale a de plus été construit et photographié par une technique de rotation similaire afin de confirmer les données de cette technique.

Construction de modèles

Nous avons construit des modèles icosaédriques simples, ainsi que des modèles similaires mais supportant 42 capsomères dont 12 d'entre eux, de forme pentagonale, ont été disposés aux sommets des modèles, et les 30 autres, hexagonaux, ont été placés sur les arêtes des triangles. Ces modèles mesurent environ 25 centimètres de diamètre (fig. 58, 59).

k — MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE — EXAMEN

Caractéristiques du microscope utilisé

L'observation des préparations a été faite sur microscope Philips 200, équipé d'une fourchette refroidie à l'azote liquide et maintenue à une température de -160°C. Le voltage d'accélération utilisé a été de 80 Kv et l'objectif était restreint par un diaphragme de 40 microns d'ouverture. L'éclairage a été réalisé au double condenseur et l'astigmatisme résiduel de la lentille objective a été compensé au moyen d'un film troué de carbone. L'image des préparations a été observée soit sur l'écran habituel du microscope soit sur des moniteurs de télévision, le microscope étant monté d'un amplificateur d'image permettant des contrastes d'une grande étendue et des grossissements allant jusqu'à 3,000,000 X, ce qui a grandement facilité l'observation de petites particules virales isolées, ainsi que la vérification fréquente de l'astigmatisme du système optique.

Enregistrement photographique

Nous avons utilisé pour l'enregistrement photographique le film Kodak "Fine Grain Positive" de format 35 mm révélé au D-19 à 20°C durant 7 minutes. Les images négatives ont été agrandies sur papier Kodak Ektamatic révélé par l'appareil du même nom, et dans tous les tirages, les émulsions des négatifs et des papiers ont été présentées "face-à-face".

Enregistrement magnétoscopique

Pour l'enregistrement au magnétoscope, le "Videocorder" Sony utilisant une bande magnétique de 25 mm de largeur a été raccordé au circuit de télévision, permettant ainsi l'étude subséquente de grilles entières déjà examinées.

CHAPITRE IV

RÉSULTATS

REPLICATION DU VIRUS DE LA DENSONUCLEOSE

Histopathogénèse de l'infection virale causée par le virus de la densonucléose.

Nous avons étudié brièvement l'histopathogénèse de l'infection virale, au microscope photonique, par les méthodes d'immunofluorescence et d'immunoperoxydase, ainsi que par la coloration à l'orangé d'acridine et par la réaction de Feulgen. Ces méthodes nous ont permis de localiser le matériel viral en vue d'études au microscope électronique.

Immunofluorescence

L'examen, par la méthode d'immunofluorescence, de coupes de glandes séricigènes et de frottis d'hémocytes préparés à partir de larves de *Galleria mellonella* infectées par le VDN, nous révèlent un marquage intranucléaire intense et, dans certains cas, un marquage intracytoplasmique (fig. 1 et 3).

Dans les cellules de larves maintenues à 32°C, la localisation du matériel antigénique viral, révélée par cette technique, est possible dans les premières 23 heures de l'infection.

Les hémocytes (fig. 1) et les cellules de la paroi d'une glande séricigène (fig. 3) représentés, ont été traités par des anticorps spécifiques anti-VDN conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine (IFTC).

Immunoperoxydase

La technique d'immunoperoxydase, à cause de sa sensibilité supérieure, indique clairement après les 10 à 12 premières heures suivant l'infection, la localisation intranucléaire précise du matériel antigénique du virus de la densonucléose. On peut voir des hémocytes (fig. 2) provenant de larves infectées, traités par l'immunsérum conjugué à la peroxydase de raifort. On observe l'activité peroxydasique intense révélée par la benzidine à l'endroit où le matériel antigénique du VDN est présent. La masse intranucléaire dense est de couleur bleu. Des grains de même couleur sont également visibles dans le cytoplasme de quelques cellules. Le marquage intracytoplasmique peu intense a lieu au début et à la fin de l'infection sous forme de grains bleutés.

Une étude plus détaillée de la localisation d'antigènes viraux à l'aide de cette technique est en cours de réalisation dans notre département.

Immunodiffusion

La technique d'Ouchterlony de double diffusion latérale en gel, nous a permis de vérifier la spécificité de nos immunsérums anti-VDN obtenus chez le lapin. La figure 5 et son schéma représenté sur la figure 6, montrent l'identité antigénique totale entre les virus purifiés et ceux contenus dans un broyat de larves infectées par le VDN. Aucune réaction de précipitation anticorps-antigène n'a été réalisée pour des raisons évidentes lorsqu'on place dans ce puits (a) un extrait de larves non infectées. La qualité et la spécificité de nos immunsérums se sont avérées très satisfaisantes. Un seul arc de précipitation apparaît (fig. 5a) dans le cas où l'immunsérum a été épuisé auparavant par un extrait aqueux de larves non infectées. Des arcs de précipitation supplémentaires sont apparus lorsque nous avons utilisé l'immunsérum non épuisé (fig. 5b). Dans ce dernier cas, les arcs supplémentaires identifient une réaction anticorps anti-protéines larvaires avec les protéines larvaires contenues dans l'extrait de l'insecte sain. Ces arcs ne démontrent pas de parenté antigénique avec l'arc résultant de la réaction de précipitation antigène VDN-anticorps anti-VDN.

Coloration à l'orangé d'acridine

Les figures 4, 7 et 8, ont été obtenues après la coloration à l'orangé d'acridine au pH 3.8.

Nous pouvons voir (fig. 4) des cellules adipeuses et hypodermiques de larves infectées depuis 14 heures, et dont le matériel nucléaire a cédé la place au matériel viral.

La paroi des glandes séricigènes de larves infectées depuis 12 heures, montrent après la coloration à l'orangé d'acridine, quelques noyeux fluorescents. La plupart des cellules conservent leur aspect normal (fig. 7).

La figure 8 nous fait voir des cellules d'une glande séricigène, de la trachée ainsi que des cellules adipeuses. Cette préparation histologique colorée à l'orangé d'acridine a été réalisée à partir d'une larve sacrifiée 20 heures après l'infection par le VDN. Les plages fluorescentes sont nombreuses et très accentuées. Le matériel viral a remplacé presque entièrement le matériel cellulaire.

Ces quelques exemples illustrent le développement des plages virogènes que l'on peut détecter par cette technique de coloration.

Les cellules saines colorées présentent au niveau de l'ADN nucléaire, une fluorescence vert-jaunâtre.

Les premiers signes de l'infection peuvent être reconnus dans le cas des glandes séricigènes, à la dixième heure après l'infection par le VDN chez des larves isolées dans des chambres maintenues à 32°C. La deuxième étape est visualisée vers la 13ème heure lorsque la périphérie de nombreux noyaux présente une fluorescence indiquant la présence de matériel viral à ce niveau. Après les 14 à 18 heures qui suivent l'infection, 60% des cellules de la paroi des glandes séricigènes possèdent des noyaux dont la périphérie fluorescente confirme l'infection. Les hémocytes présentant ce phénomène à ce stade de l'infection sont dans une proportion de 40%.

On peut, dès ce moment, commencer à distinguer des plages fluorescentes intranucléaires de petites dimensions. Ces plages progressent proportionnellement au temps d'infection et se rejoignent pour occuper, vers la vingtième heure, la totalité de la surface nucléaire. Cette fluorescence est franchement vert-jaunâtre.

Le noyau est très hypertrophié après la 20ème heure et l'intensité de sa fluorescence est considérablement augmentée. La structure nucléaire propre aux cellules saines n'existe pratiquement plus. Ce noyau hypertrophié devenu une masse dense, compacte, très fluorescente, ne ressemble d'aucune façon au noyau d'une cellule normale, ni par son aspect morphologique, ni par son aspect fluorescent.

Réaction de Feulgen

Après la réaction de Feulgen sur des coupes de glandes séricigènes d'une larve infectée depuis 72 heures, nous avons obtenu une réaction fortement positive au niveau des cellules infectées (fig. 9).

Les cellules du tissu adipeux ainsi que celles de la trachée, montrent 36 heures après l'infection, un matériel fortement Feulgen positif. La majorité des cellules possèdent des lésions caractéristiques de cette infection virale.

Cette technique ne permet pas de révéler aussi rapidement les lésions cellulaires dues à l'infection virale. Nous enregistrons avec cette méthode un décalage de quelques heures dans l'apparition de ces lésions en comparaison avec les méthodes de coloration à l'orangé d'acridine.

Digestions enzymatiques

Les traitements enzymatiques à l'ARNase et à l'ADNase, effectués sur coupes de 4 microns obtenues au cryotome, nous ont donné les résultats suivants:

L'ARNase utilisée durant 24 heures à une concentration de 0.05 mg/ml et maintenue à 37°C n'a pas altéré les cellules préalablement baignées durant 1 heure à 37°C dans une solution de pepsine à 0.02%.

L'ADNase utilisée après ce même traitement à la pepsine, a extrait le matériel nucléaire des cellules après un contact de 24 heures à 37°C. La solution d'ADNase a été utilisée à une concentration de 0.05 mg/ml.

Nous avons pu constater par ce traitement à l'ADNase, la nature ADN des plages virosées, ce qui confirme les résultats obtenus par la coloration à l'orangé d'acridine et par la réaction de Feulgen.

FIGURES No. 1 à 10

Figure 1

Localisation du matériel antigénique du virus de la densovirose par la technique d'immunofluorescence. Hémocytes de larve de *Galleria mellonella* infectée par le virus depuis 23 heures à 32°C. Nous pouvons noter le marquage intranucléaire intense, et dans certains cas, le marquage intracytoplasmique. Microscopie photonique. 500 X.

Figure 2

Localisation du matériel antigénique du VDN, révélée par la technique d'anticorps conjugués à l'enzyme peroxydase. Hémocytes, 10-12 heures après l'infection. Différents stades de marquage intranucléaire et intracytoplasmique peuvent être observés. 450 X.

Figure 3

Marquage intranucléaire des cellules de la paroi d'une glande séricigène infectée par le VDN. Technique d'immunofluorescence. 500 X.

Figure 4

Cellules adipeuses et hypodermiques. Remplacement de la structure cellulaire par le matériel viral. Coloration à l'orangé d'acridine, pH 3.8. 900 X.



Fig. 1

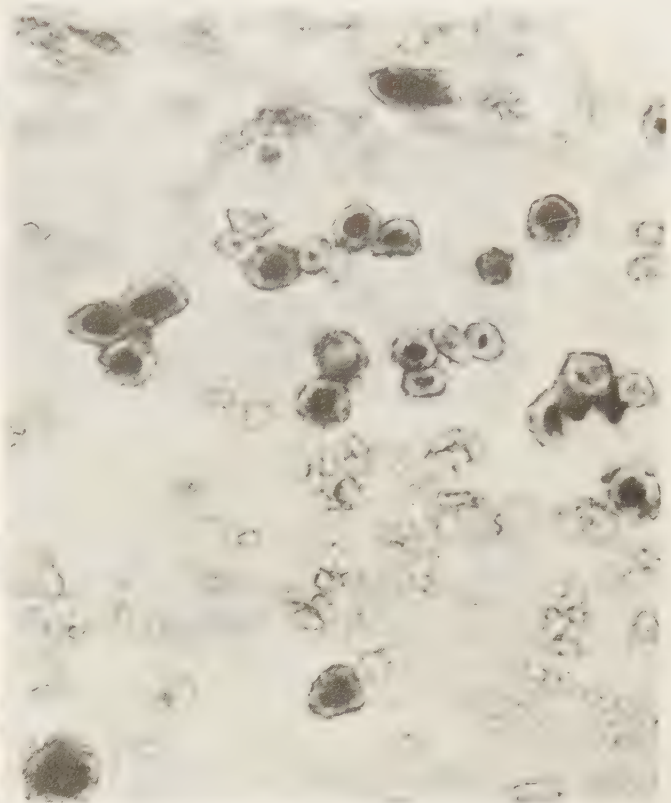


Fig. 2



Fig. 3



Fig. 4

Figures 5 et 6

Examen de la spécificité et de la qualité d'immunsérums anti-VDN, par la micro-technique de diffusion latérale en gel.

Immunsérums: 1- immunsérum anti-VDN épuisé par un broyat de larves saines en PBS et conjugué à l'ITFC.

2- immunsérum anti-VDN non épuisé et non conjugué.

Antigènes: a- broyat de larve saine.

a1- broyat de larve infectée par le VDN (auto-infection).

b- broyat de larve infectée par le VDN (expérimentalement).

c- suspension de virus purifiés.

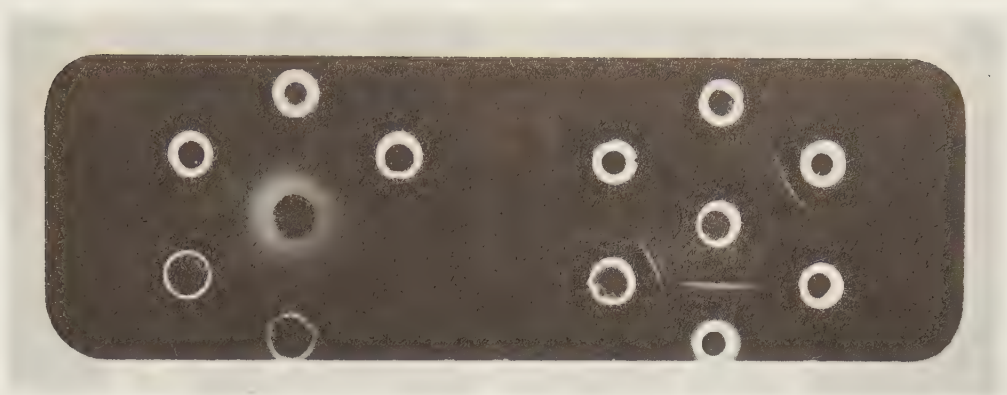


Fig. 5

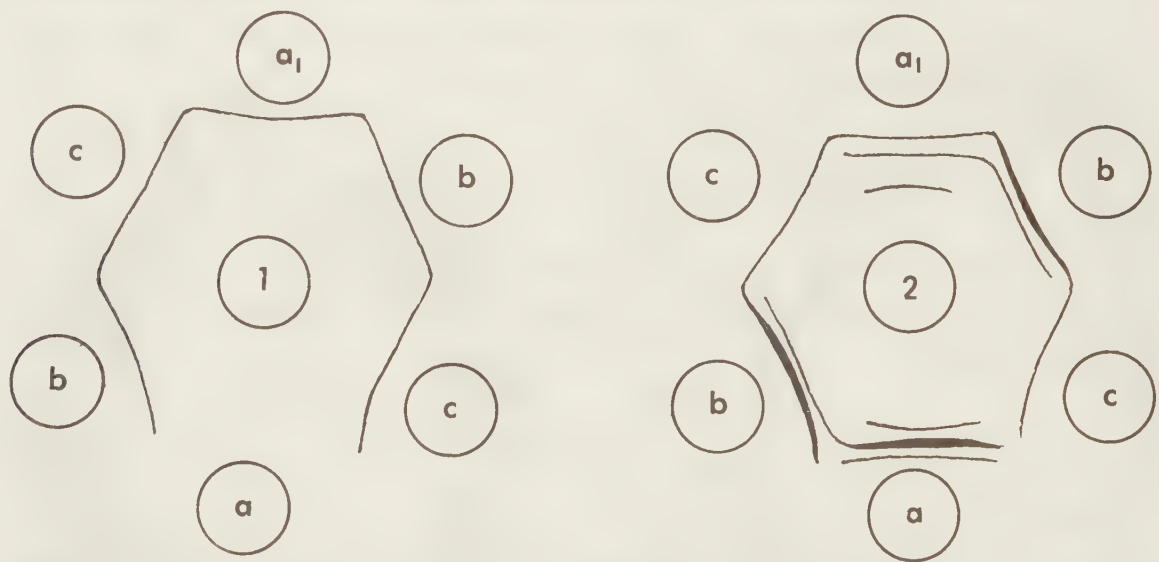


Fig. 6

Figure 7

Paroi de glandes séricigènes. Aspect des cellules au début de l'infection. Larve infectée depuis 12 heures. Le matériel nucléaire de la plupart de ces cellules dont la structure est normale, contraste avec les plages denses intensément fluorescente apparaissant dans quelques noyaux. Coloration à l'orangé d'acridine. 700 X.

Figure 8

Glande séricigène, trachée et tissu adipeux. Aspect après 20 heures d'infection. On remarque le remplacement du matériel cellulaire par le matériel viral. Coloration à l'orangé d'acridine. 850 X.

Figure 9

Aspect des cellules de la paroi de la glande séricigène infectée par le virus depuis 72 heures. Le matériel apparaissant à la suite de l'infection, est fortement Feulgen positif. 400 X.

Figure 10

Trachée et cellules adipeuses. Matériel fortement Feulgen positif après 36 heures d'infection par le VDN. La majorité des cellules montrent des lésions caractéristiques de cette infection virale. 520 X.



Fig. 7

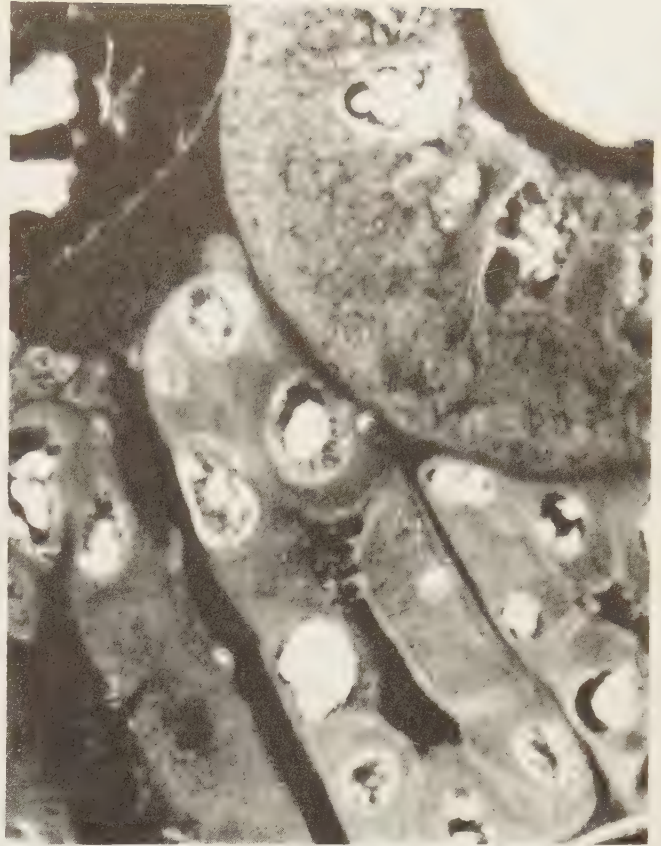


Fig. 8



Fig. 9

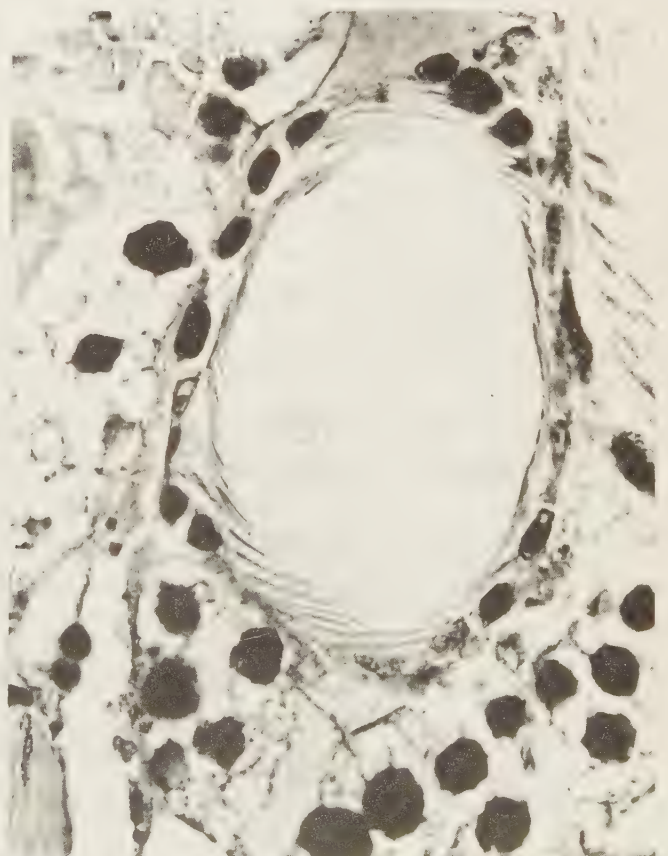


Fig. 10

Microscopie électronique sur coupes fines.

Etude de la réplication virale au niveau de l'hypoderme.

Lors de l'examen au microscope électronique de coupes fines obtenues de larves saines, nous pouvons voir au niveau de l'hypoderme des cellules présentant une ultrastructure normale et dont on peut étudier l'aspect sur les figures 11 et 12. Nous avons contrasté ces coupes par le double coloration à l'acétate d'uranium et au citrate de plomb.

Les micrographies des figures 13 et 14 nous font voir l'aspect des cellules de l'hypoderme d'une larve, 15 heures après l'infection par le virus de la denso nucléose. Le noyau de grande dimension, vers la gauche de la micrographie, est dépourvu presque entièrement de son matériel normal. Observé à un plus fort grossissement, ce même noyau (à la droite de la figure 14) nous révèle un nombre élevé de virions.

Vingt heures après l'infection (fig. 15 et 16), on peut constater, en comparaison avec les figures précédentes (13 et 14) une augmentation importante du nombre de virions au sein des noyaux des cellules hypodermiques. Le matériel nucléaire est totalement absent et des myriades de virions l'ont remplacé.

La membrane nucléaire est rompue sous la pression exercée par la multitude des particules, et lorsque l'incidence de coupe le permet, on peut observer clairement le point de rupture et le passage des virions dans le cytoplasme (fig. 15 et 16).

Si l'observation du passage des virions dans le cytoplasme peut être faite fréquemment, leur regroupement en inclusion paracrystalline reste moins fréquent. On peut toutefois observer ces formations à l'extérieur du noyau, dans les figures 16 et 17.

Nous pouvons aussi observer le noyau d'une cellule hypodermique infectée, en division, dont le matériel nucléaire a été complètement détruit et remplacé par les particules virales de la denso nucléose (fig. 18).

Etude de la réplication virale au niveau des glandes séricigènes.

Les glandes séricigènes des larves de *Galleria mellonella* font partie du spectre d'infection du virus de la denso nucléose, dont la réplication peut se faire dans presque toutes les cellules de cette larve qui est son hôte d'origine.

Les noyaux des glandes séricigènes de larves saines présentent un polymorphisme bien connu. Deux de ces noyaux sont présentés dans les figures 19 et 20, et l'image

retenue dans la figure 20 ne représente qu'environ la moitié du noyau allongé présent dans la coupe étudiée.

Nous pouvons déceler, 13 heures après l'inoculation du VDN, la formation des premiers virions au sein des noyaux des glandes séricigènes (fig. 21). Le nombre des particules virales augmente rapidement et nous observons chez des larves infectées depuis 15 heures un accroissement appréciable des virions (fig. 22).

Un autre aspect des cellules des glandes séricigènes altérées après 13 heures d'infection, peut être étudié dans la figure 23. A ce stade de l'infection, le cytoplasme offre encore une morphologie normale.

Nous avons également étudié des coupes fines de glandes séricigènes infectées 24 heures avant leur prélèvement. L'ensemble des cellules est fortement dégradé et le matériel normal, remplacé par les virions (fig. 24).

De plus, certaines de ces cellules contiennent comme dans le cas des cellules hypodermiques, des inclusions paracrystallines (fig. 25). La dégradation des composants cellulaires peut être également remarquée dans la figure 26.

Immunoperoxydase

La technique de l'immunoperoxydase dont nous avons présenté précédemment quelques résultats obtenus à l'aide de la microscopie photonique, a été utilisée également au niveau de la microscopie électronique.

Nous pouvons voir tout d'abord, un noyau de forme allongée, normal, propre aux cellules des glandes séricigènes (fig. 27), et qui peut se comparer au noyau des cellules formant les figures 19 et 20.

Après la conjugaison des anticorps anti-VDN à l'enzyme peroxydase, et l'incubation dans ce milieu de coupes de 5 microns exécutées au cryotome, nous avons obtenu, à l'examen des coupes ultrafines de ces cellules, les résultats que l'on peut voir dans les figures 28, 29 et 30.

La figure 28 présente, au niveau de la paroi d'une glande séricigène d'une larve infectée depuis 5 heures, un noyau allongé caractéristique de ces organes. Les sites antigéniques de ce noyau infecté ont retenu intensément les anticorps anti-VDN conjugués

à la peroxydase. Ce dernier marqueur a été contrasté en vue de l'optique électronique par le citrate de plomb.

L'examen a un plus fort grossissement (fig. 29 et 30) révèle d'autres zones denses au niveau du matériel antigénique, et le regroupement des virions après la pénétration d'anticorps spécifiques dans les cellules.

Autoradiographie

Nous avons pu visualiser par les méthodes d'autoradiographie, les sites de synthèse de l'acide nucléique au moment de la réplication du virus de la denso-nucléose au niveau des glandes séricigènes de larves de *Galleria mellonella*.

De nombreux grains d'argent ont pu être décelés dans les noyaux des cellules infectées, tant en microscopie photonique (fig. 31) qu'en microscopie électronique (fig. 32). Dans ce dernier cas, la résolution de l'optique électronique d'une part, et le peu de matériel radioactif contenu dans le volume très réduit d'un champ observé d'autre part, ne permettent pas l'obtention de masses aussi denses que celles observées en microscopie photonique.

Dans ces conditions similaires, aucun grain d'argent, si l'on fait exception d'un léger voile, n'a pu être révélé dans les cellules saines.

FIGURES No. 11 à 32

Figure 11

Noyau et cytoplasme. Cellule de l'hypoderme de larve non infectée. Microscopie électronique. Double coloration à l'acétate d'uranium et au citrate de plomb. 22,000 X.

Figure 12

Aspect présenté par deux cellules hypodermiques non infectées. 14,500 X.

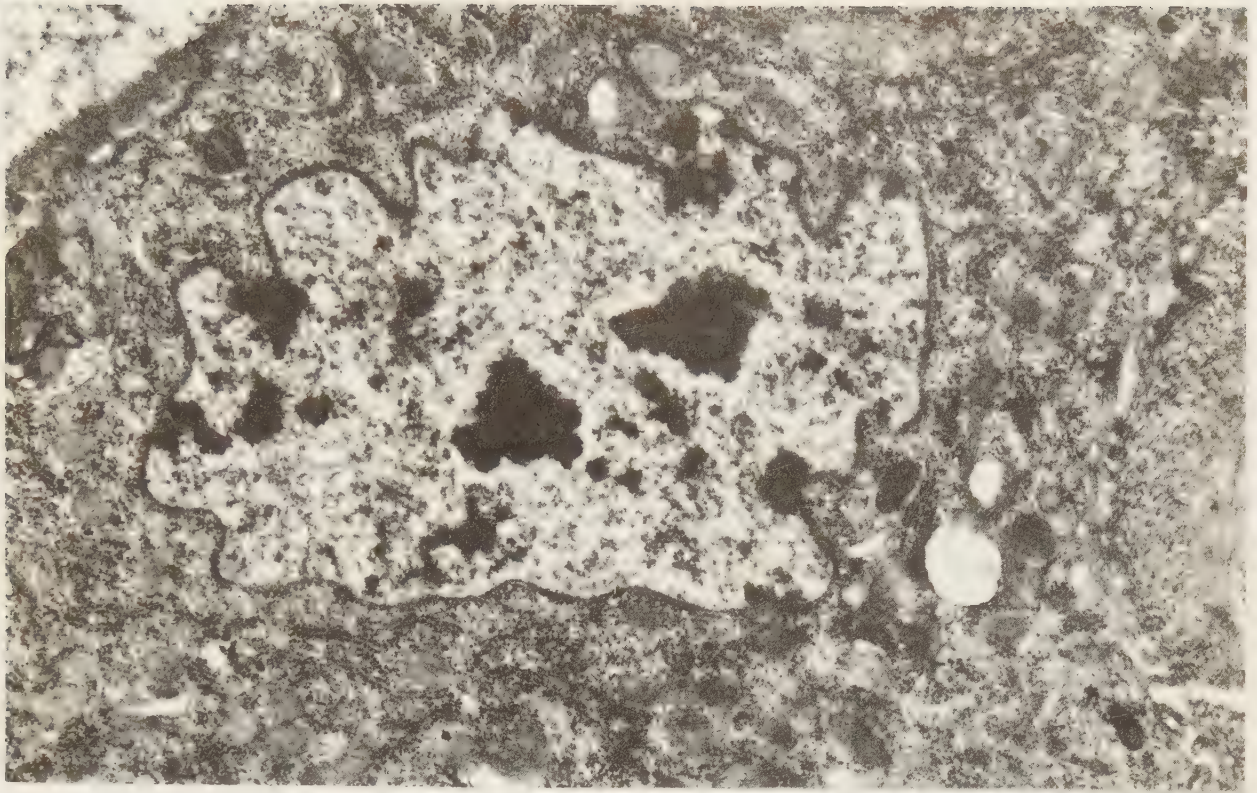


Fig. 11

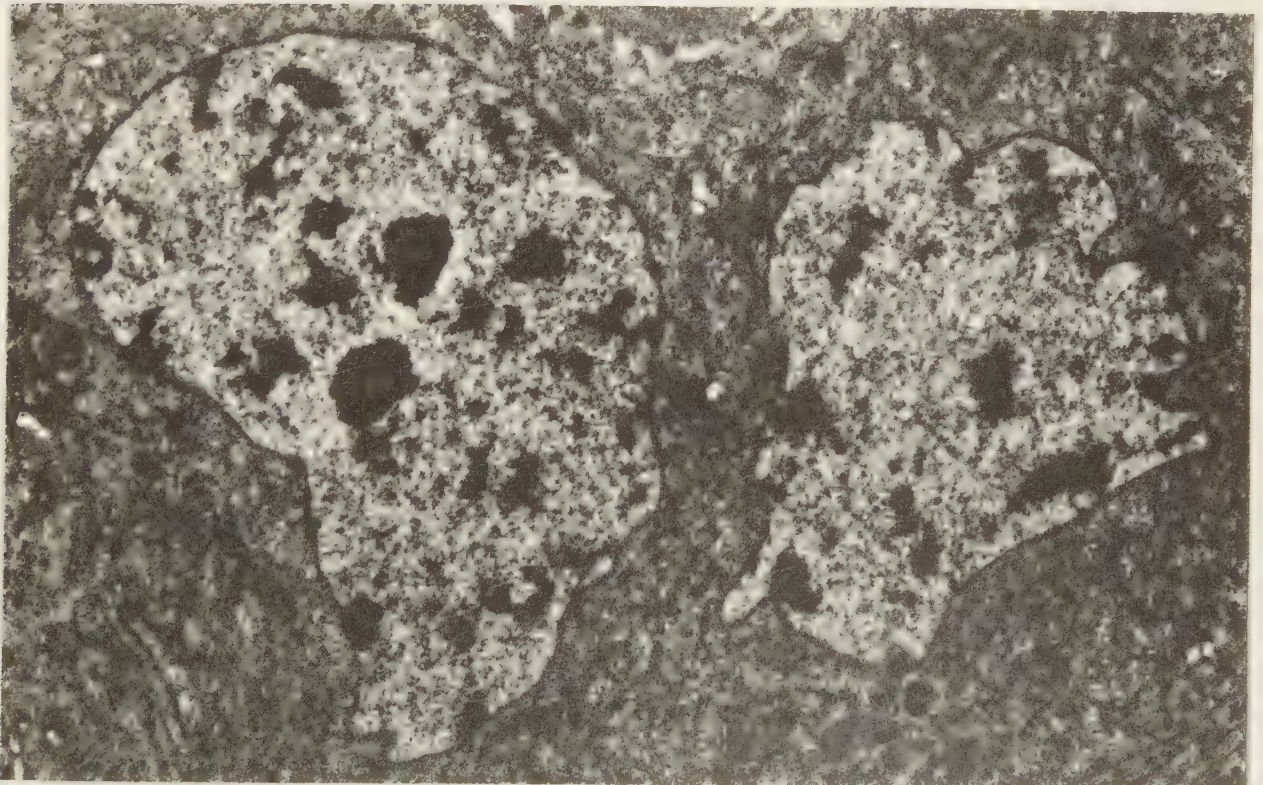


Fig. 12

Figure 13

Cellules de l'hypoderme d'une larve infectée depuis 15 heures. Le noyau de la cellule (—▶) est remplacé en partie par les particules du VDN. 11,250 X.

Figure 14

A un plus fort grossissement, on observe dans le noyau à droite, un nombre élevé de virions qui ont remplacé le matériel nucléaire normal, tel qu'observé dans le noyau à gauche de la micrographie. 42,500 X.

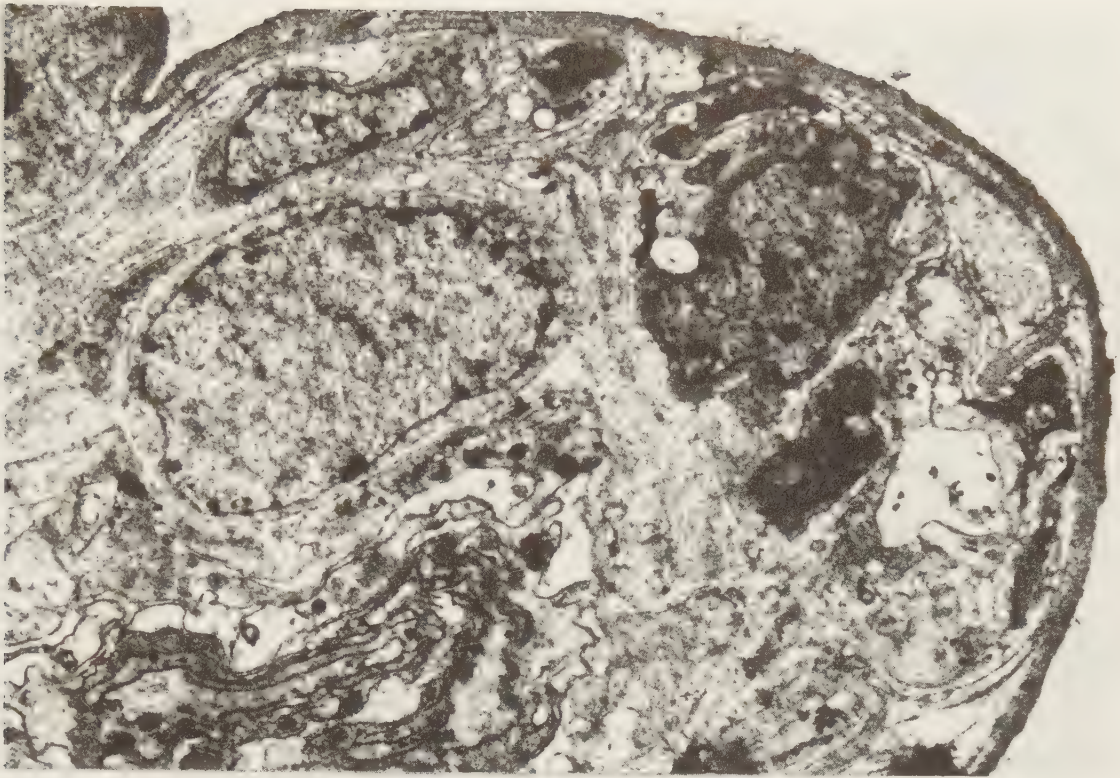


Fig. 13

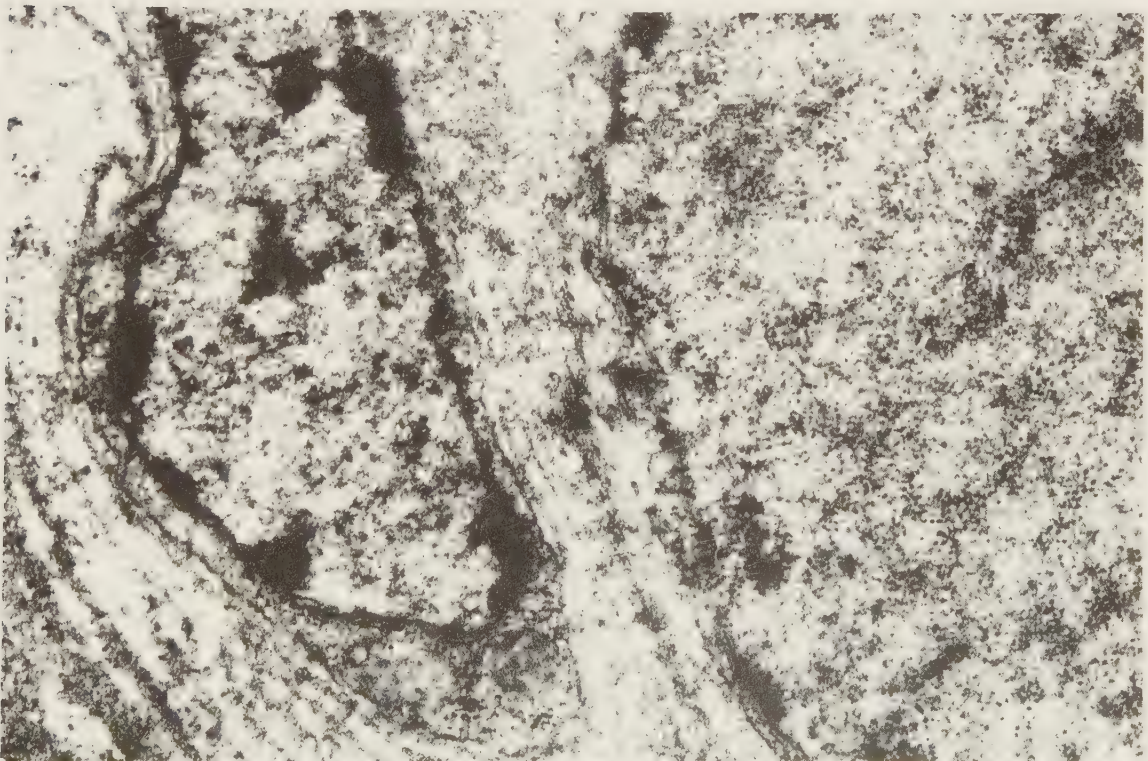


Fig. 14

Figures 15 et 16

Cellules hypodermiques d'une larve infectée depuis 20 heures. On note une augmentation importante du nombre de virions dans le noyau et leur passage dans le cytoplasme après la rupture de la membrane nucléaire (→) (fig. 15). 51,000 X.

On peut également noter que les virions passés dans le cytoplasme entraînent une partie de la membrane nucléaire brisée (→). Virions groupés en inclusion paracristalline (IPC) (fig. 16). 56,000 X.

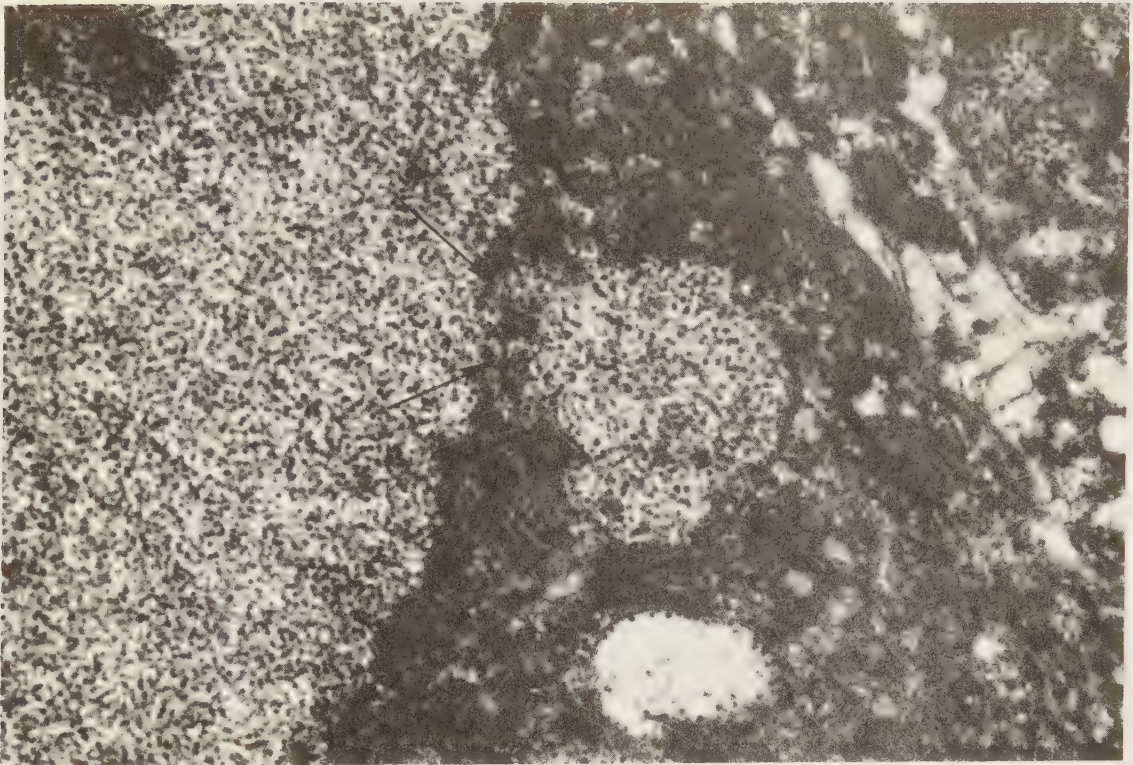


Fig. 15

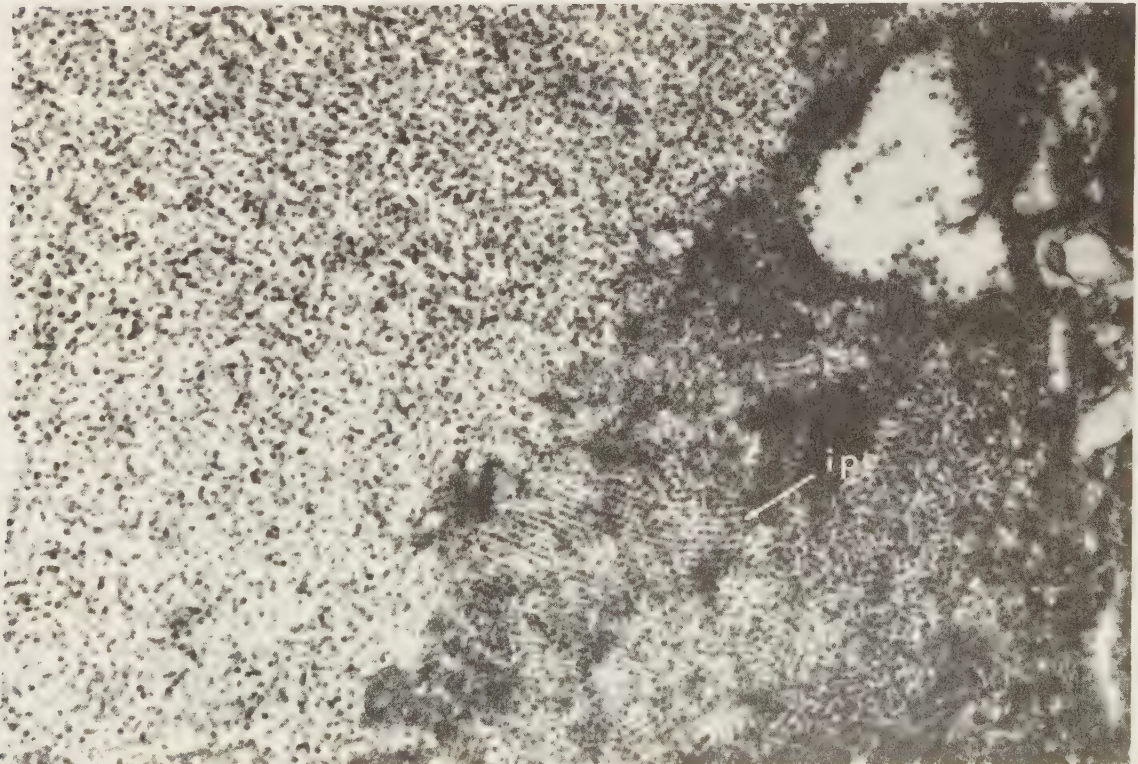


Fig. 16

Figure 17

Un autre aspect du passage des virions du noyau dans le cytoplasme d'une cellule hypodermique infectée. On peut noter l'absence de matériel cytoplasmique normal qui a été remplacé par des plages de virions. Présence d'une inclusion paracristalline de virions. 46,750 X.

Figure 18

Noyau d'une cellule hypodermique infectée en division. Le matériel nucléaire a été remplacé par les particules virales. 72,280 X.

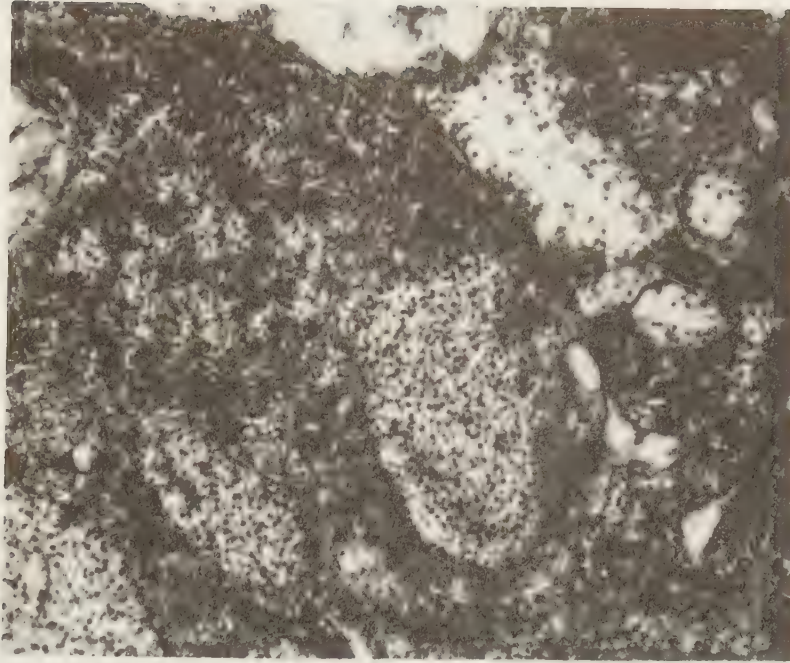


Fig. 17

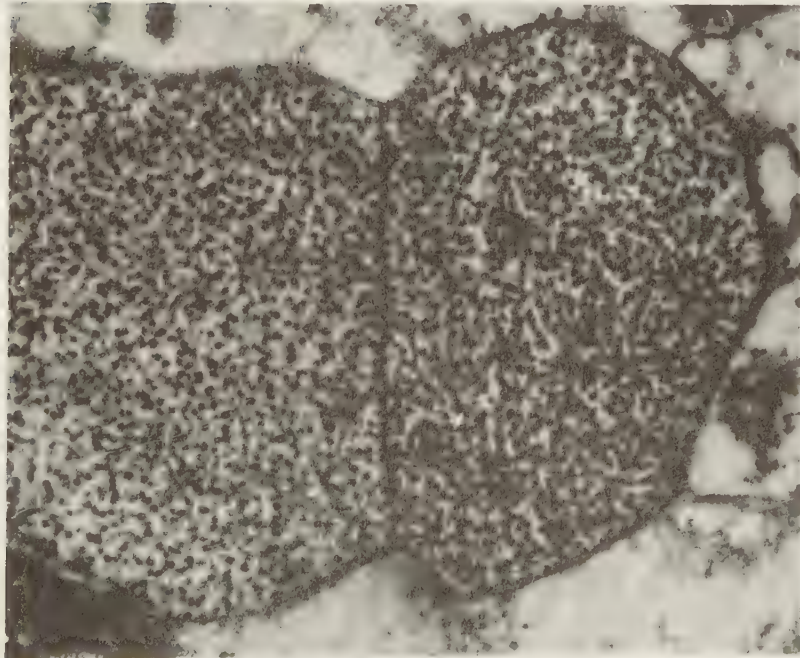


Fig. 18

Résultats 19 et 20

Cellules de la paroi des glandes séricigènes de larves saines. Polymorphisme des noyaux (fig. 19). 9,000 X; (fig. 20). 4,200 X.

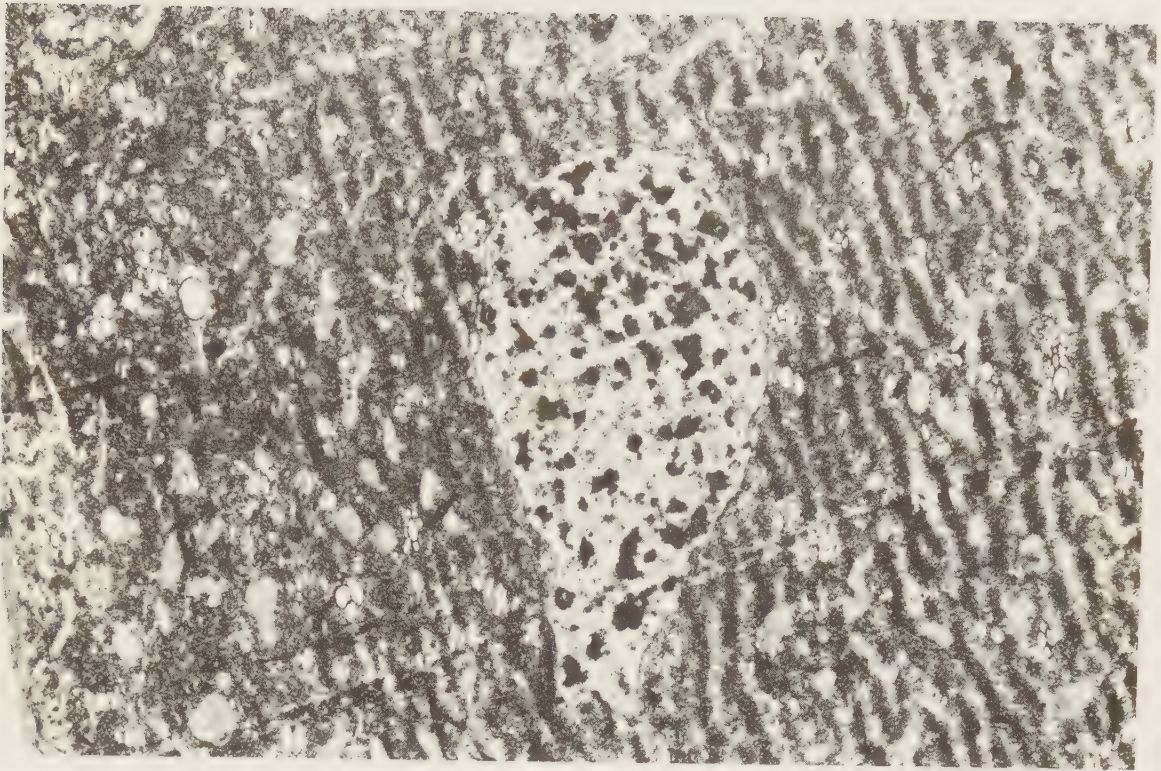


Fig. 19

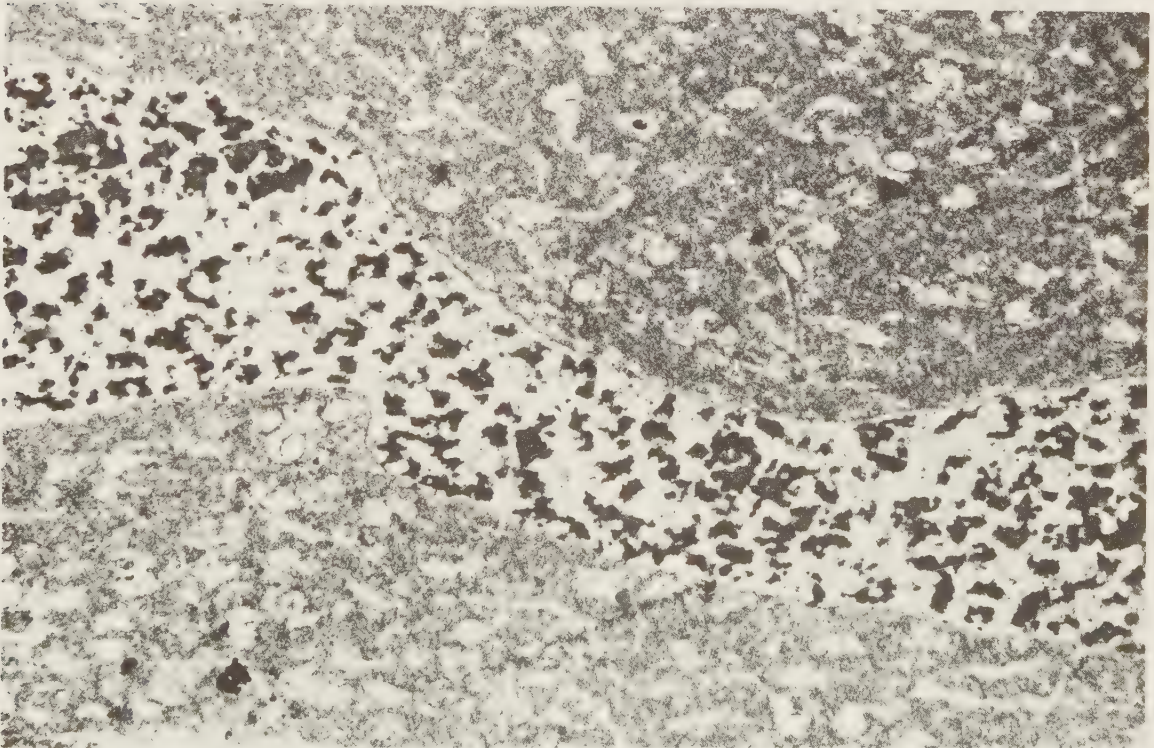


Fig. 20

Figures 21 et 22

Cellules de la paroi des glandes séricigènes de larves infectées par le VDN.
Apparition des premiers virions au début de l'infection (13 heures) (fig. 21).
14,000 X.

Augmentation du nombre de virus dans le noyau après 15 heures d'infection
(fig. 22). 17,400 X.

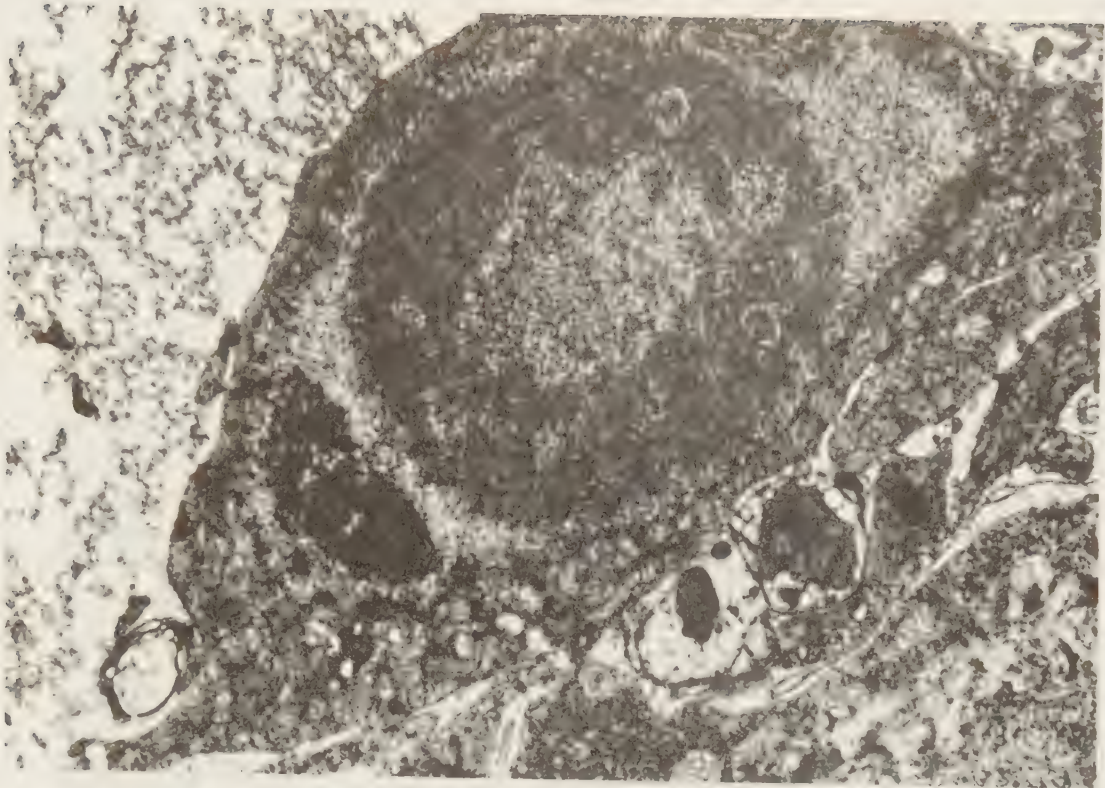


Fig. 21

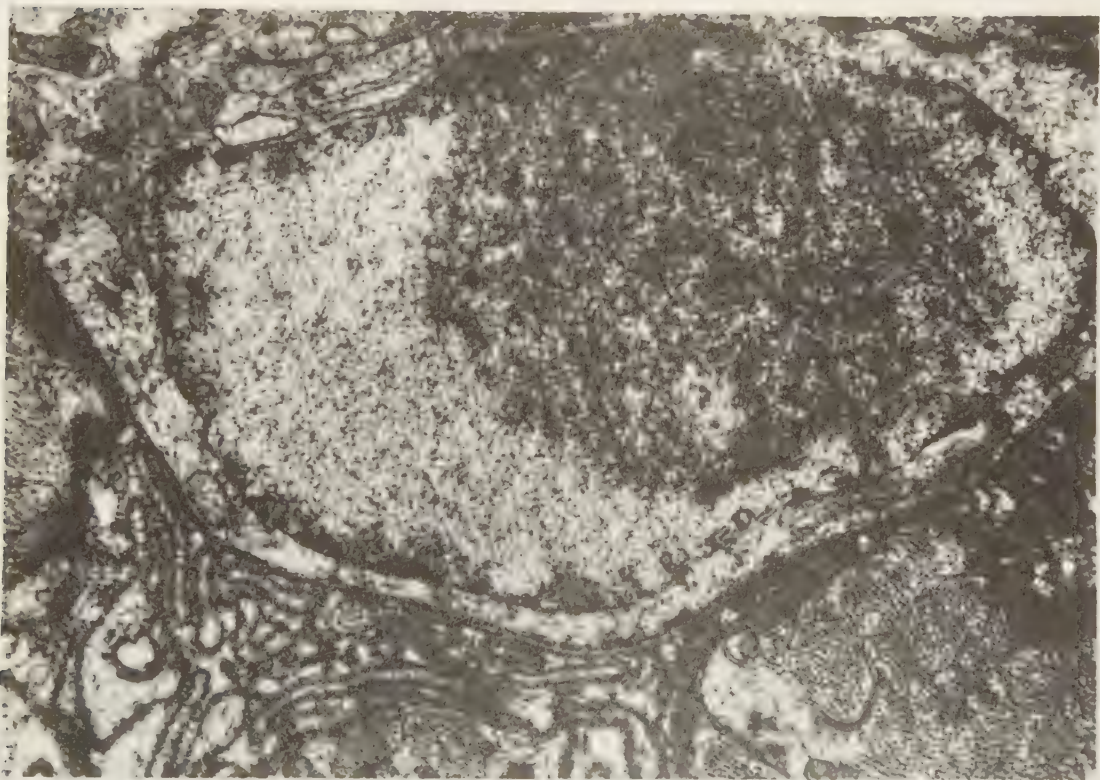


Fig. 22

Figures 23 et 24

Un autre aspect des noyaux d'une glande séricigène envahis par le virus de la densonucléose. On peut noter que le matériel cytoplasmique est partiellement dégradé à ce stade de l'infection (fig. 23). 13,500 X.

Ce matériel est fortement lysé et remplacé par le VDN à la 24ème heure après l'infection (fig. 24). 42,500 X.



Fig. 23

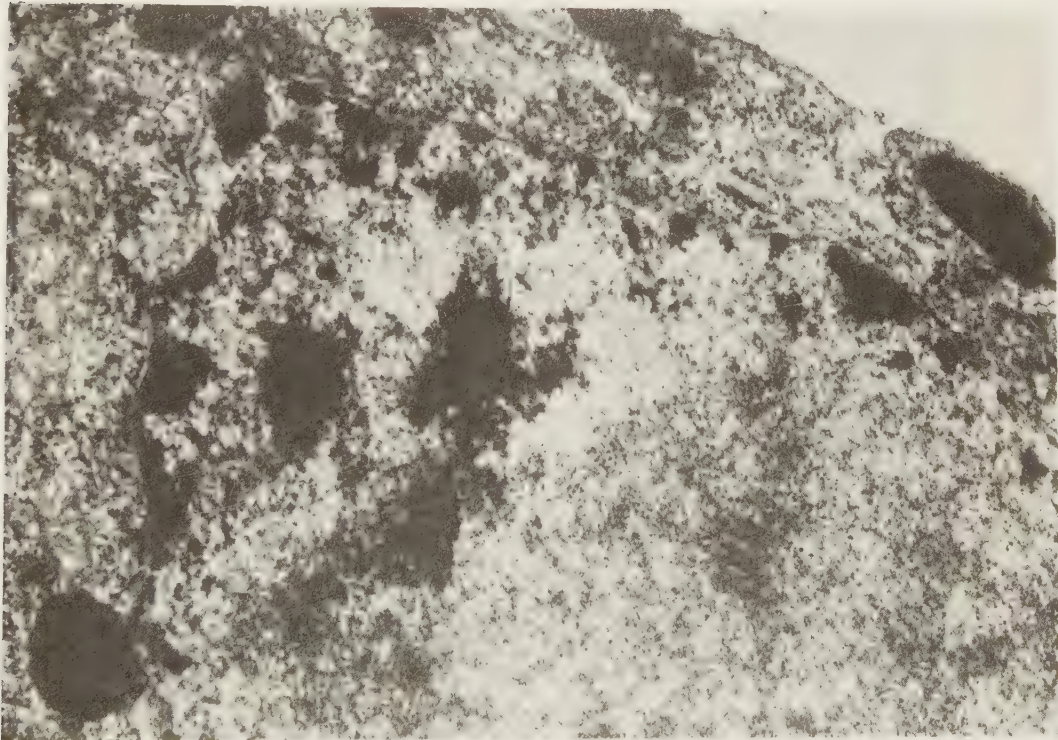


Fig. 24

Figures 25 et 26

Dégradation du matériel cellulaire des glandes séricigènes, due à l'infection (24 heures) par le virus de la densonucléose. On peut noter les inclusions paracrystallines virales, (fig. 25). 85,000 X; (fig. 26). 38,000 X.

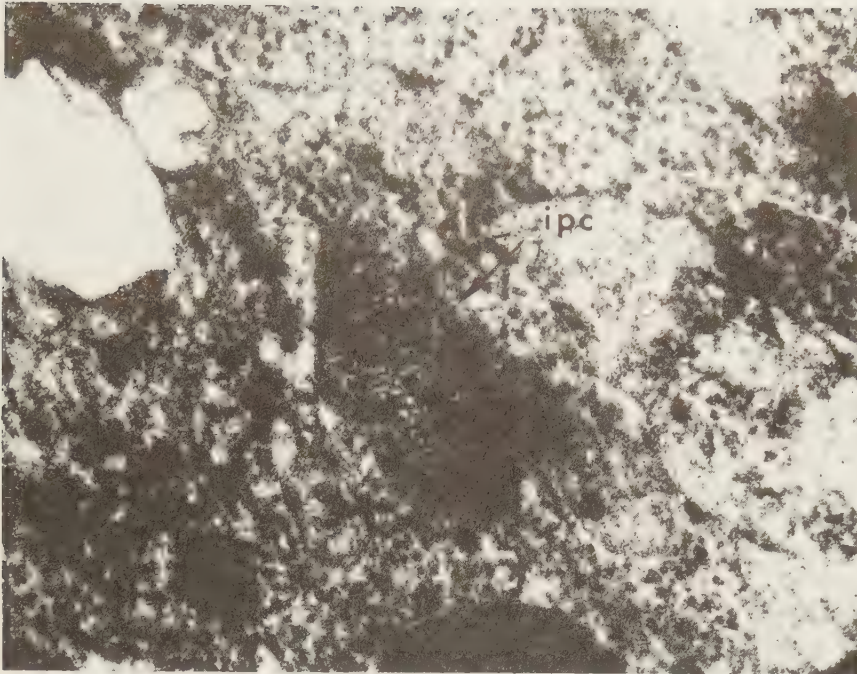


Fig. 25

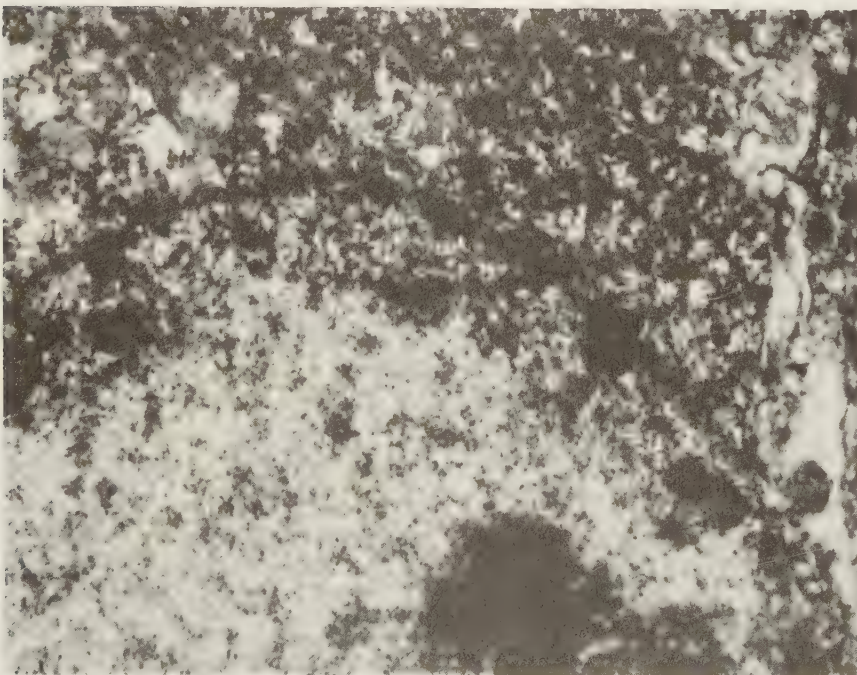


Fig. 26

Figure 27

Cellule de la paroi cellulaire d'une glande séricigène normale, 4,000 X.

Figure 28

Immunoperoxydase: marquage du matériel antigénique du virus (région dense aux électrons) (—→) révélé au microscope électronique par la technique de conjugaison d'anticorps anti-VDN, à l'enzyme peroxydase. Larve infectée depuis 5 heures. Paroi de glande séricigène. 11,200 X.

Figure 29

Immunoperoxydase: un autre aspect montrant un stade plus avancé de l'infection. Présence de particules virales et de zones denses du matériel antigénique révélé par l'immunoperoxydase. 15,200 X.

Figure 30

Immunoperoxydase: regroupement de virions (—→) après la pénétration d'anticorps spécifiques dans la cellule. 21,600 X.

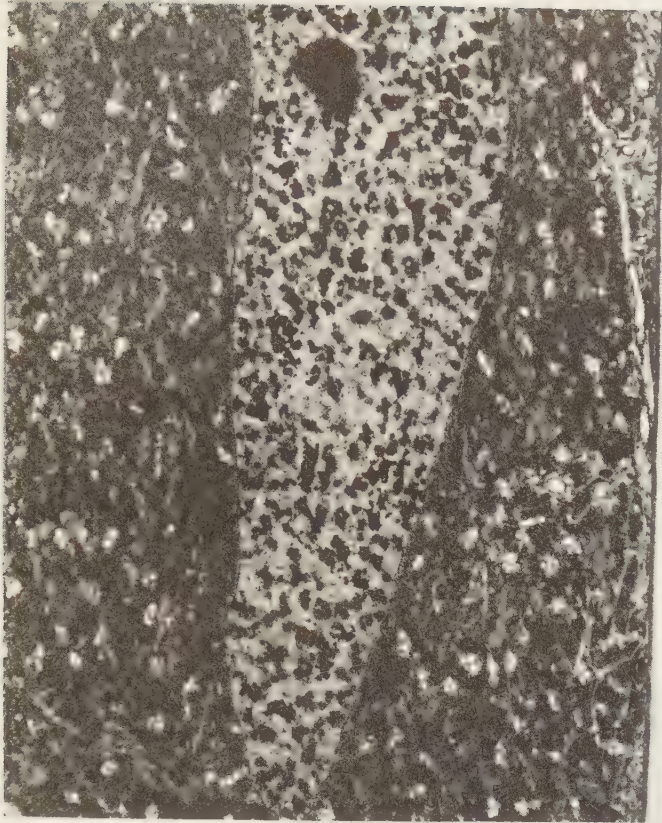


Fig. 27

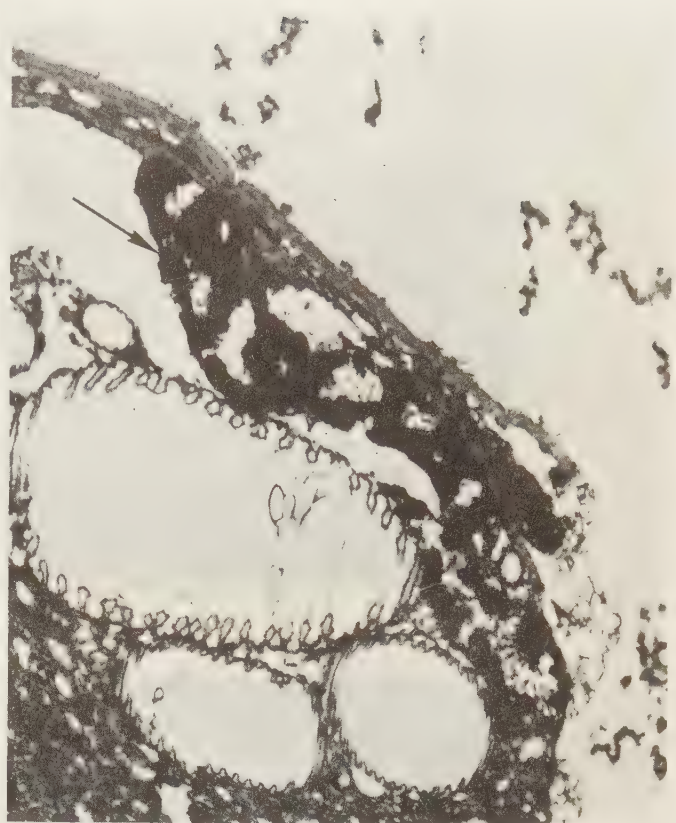


Fig. 28

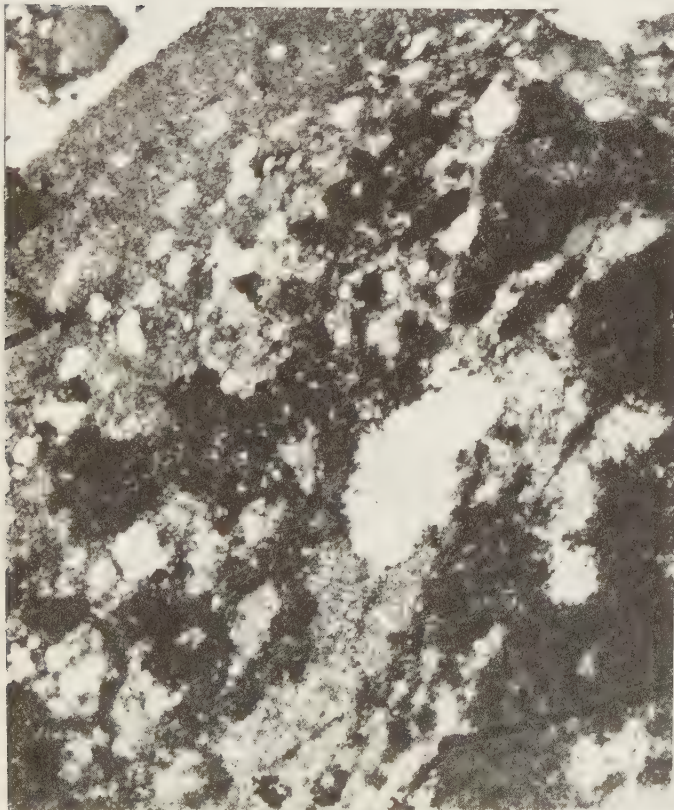


Fig. 29

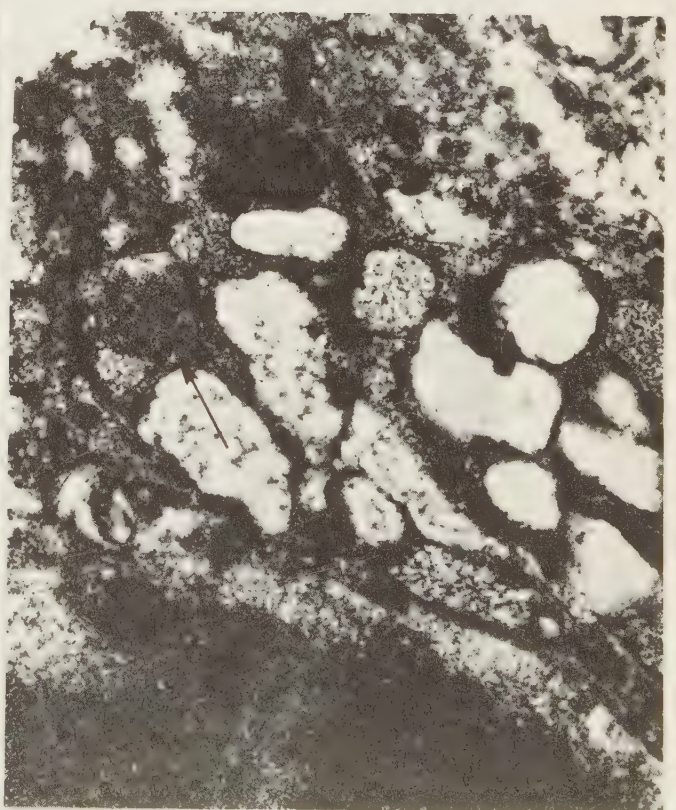


Fig. 30

Figures 31 et 32

Autoradiographie: incorporation de la thymidine tritiée dans les noyaux des cellules d'une glande séricigène d'une larve infectée par le VDN depuis 8 heures. Microscopie photonique (fig. 31). 1,400 X.

Cette technique d'autoradiographie au microscope électronique révèle effectivement l'incorporation intranucléaire de H_3 dans l'acide désoxyribonucléique viral. Aspect après 5 heures d'infection (fig. 32). 18,000 X.

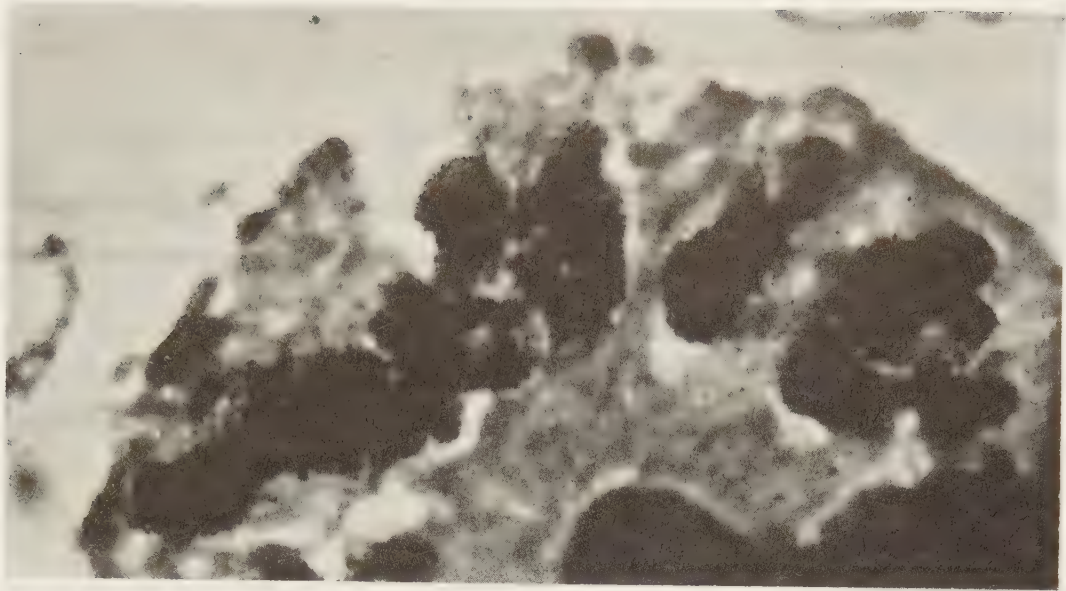


Fig. 31

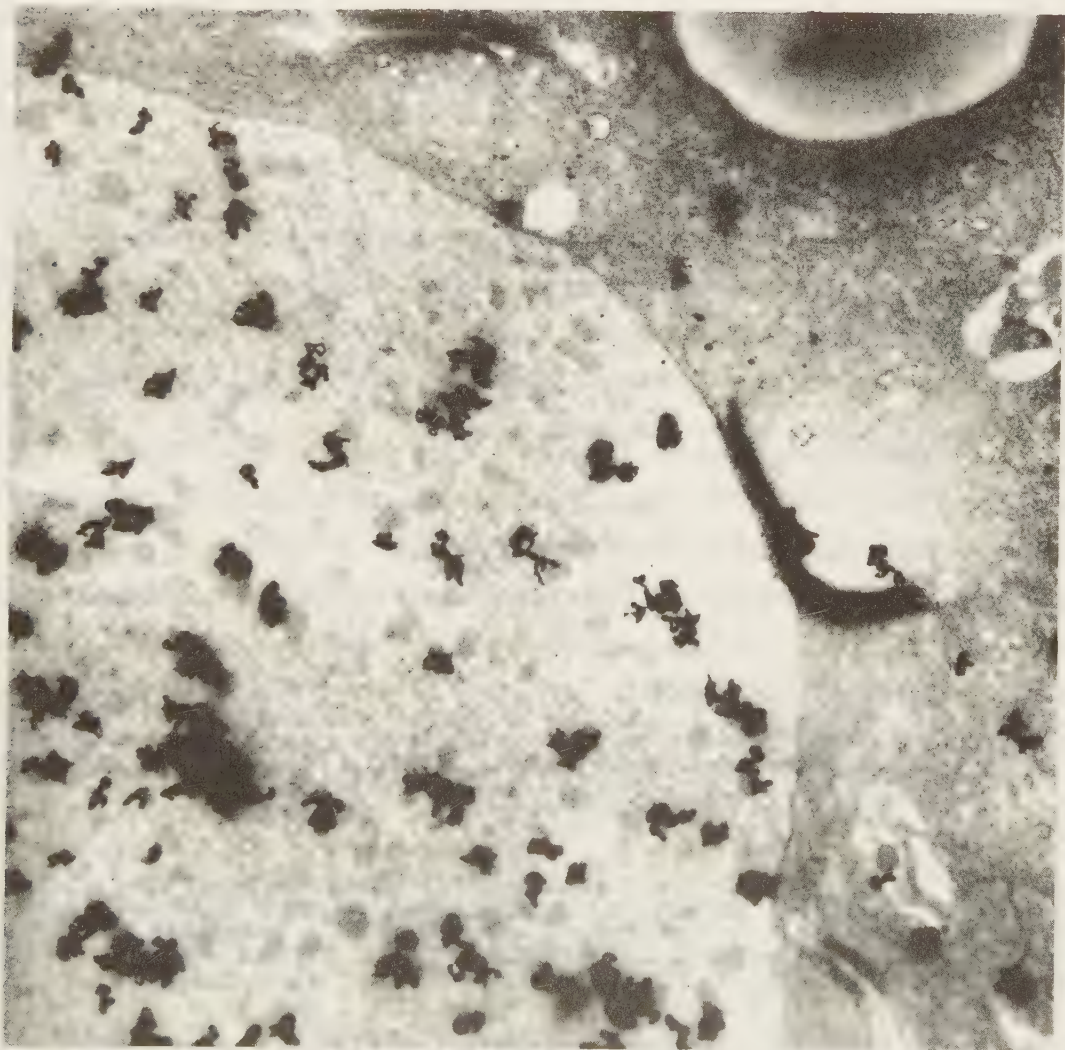


Fig. 32

MORPHOLOGIE DU VIRUS DE LA DENSONUCLÉOSE

a — Virus purifiés par la méthode de centrifugation préparative - ou - obtenus à partir d'hémolymphe de larves infectées et préparées par les méthodes rapides de diagnostic.

Les particules virales, obtenues à partir de l'hémolymphe de larves infectées, sont montées sur grilles par les méthodes rapides de diagnostic (Doane et al., 1968), et ont donné des résultats (fig. 33) semblables à ceux obtenus par la méthode de centrifugation préparative (fig. 34).

En coloration négative à l'acide phosphotungstique à 2% tamponné au pH 6.5 à l'hydroxyde de potassium, on peut voir (fig. 33) une particule pleine (claire) et une particule vide (centre sombre) du virus de la densonucléose. Des particules virales associées de plus petite dimension, l'une pleine et les autres vides, apparaissent également sur cette micrographie. Ces particules associées peuvent être aussi étudiées sur les figures 35 et 36.

D'après ces micrographies électroniques (fig. 33, 34, 35, 36), on peut voir que le virus de la densonucléose et sa particule associée sont sphériques et structurés, que ces deux particules présentent des formes pleines que le phosphotungstate a entourées, et des formes vides où le phosphotungstate opaque a pénétré. Des mensurations faites sur ces particules indiquent un diamètre de $200 \text{ \AA}$ pour le virus de la densonucléose, et un diamètre d'environ $70\text{-}100 \text{ \AA}$ pour la particule associée.

Le tapis de fines particules blanches que l'on peut voir sur les figures 33 et 36, reste irrésolu par les possibilités actuelles de la coloration négative. Le montage de ces préparations, sur membranes de carbone, rend à fort grossissement l'image de fond propre à ce support.

La sphéricité du virus de la densonucléose et de sa particule associée est confirmée en relevant leur troisième dimension, en les ombrant sous vide par l'évaporation de l'agglomérat de carbone-platine réalisé sous un angle de 40° par rapport à la source d'évaporation.

La figure 37 nous montre, en ombrage positif, la projection de l'image des deux particules que l'on peut voir à plus fort grossissement dans la figure 38. Un certain affaissement demeure évident, quoique ces préparations aient été obtenues par lyophilisation.

b — Virus préparés et purifiés par la méthode de centrifugation différentielle.

Après avoir été préparé et purifié par la méthode de centrifugation différentielle, le virus de la denso nucléose a été recueilli sans sa particule associée (fig. 39 à 45), et nous avons pu réaliser une concentration plus grande de ces particules virales.

Les particules du VDN apparaissent alors sous des formes pleines (claires), vides (sombres) et partiellement vides (fig. 39 à 43). Les éléments clairs qui forment ces particules correspondent aux capsomères. Ils hérissent la surface des particules pleines et la périphérie des particules vides. L'agent contrastant s'est inséré entre ces sous-unités.

Les formes pleines qui forment la majorité des images particulières, laissent voir des capsomères creux où l'acide phosphotungstique opaque a plus ou moins bien pénétré. Ces bourgeonnements à la surface des virions montrent un arrangement symétrique chez certaines particules. Chez d'autres, un déplacement causé par la déshydratation ou par les techniques de préparation produit des espaces variables entre les capsomères. Le contour de quelques virions présente une forme hexagonale parfaite (fig. 39).

Les formes vides dont le centre est sombre, présentent une couronne formée par 12 capsomères disposés en cadran d'horloge. Ces capsomères se présentent, pour la plupart, comme un fin point clair et quelques uns offrent l'image d'un centre creux ayant laissé pénétré l'acide phosphotungstique opaque (fig. 37).

Les formes partiellement vides (fig. 40 à 43), en tenant compte de la géométrie des plages sombres, laissent supposer un détachement de groupes de capsomères. Nous pouvons examiner sur les figures 40 et 41, des particules du VDN où les plages sombres, plus ou moins parfaitement triangulées, ont laissé pénétrer le phosphotungstate. La figure 41 offre des particules du VDN présentant presque exactement la moitié de leur surface en contraste clair, et l'autre en contraste sombre. La figure 42 contient un échantillonnage des diverses formes géométriques que peut présenter le virus de la denso nucléose, et la figure 43 ajoute au centre supérieur d'un groupe de virions, une particule au centre clair et aux contours sombres.

Nous pouvons aussi noter que dans un champ d'observation contenant de nombreuses particules, la préparation semble être débarrassée presque parfaitement des débris cellulaires.

Nous avons aussi rencontré, mais rarement, dans le cas de lots de virus moins bien purifiés et présentant une netteté douteuse lors de leur examen au microscope électronique, des particules virales entourées d'une auréole (fig. 44 et 45). Le centre plein de ces virions possède une dimension identique au diamètre intérieur des particules en couronne (fig. 44).

c — Virus préparé et purifié par la méthode de centrifugation en gradient de densité en sucrose.

Les particules virales du VDN après avoir été purifiées par l'ultracentrifugation en gradient de densité en sucrose, se présentent en enlignements presque parfaits (fig. 46 à 48). Elles possèdent un haut degré de purification et leur concentration est élevée. Ces particules ainsi enlignées s'appuyant les unes sur les autres, la conservation de leur forme géométrique sphérique est améliorée, ce qui nous a permis d'obtenir pour la presque totalité d'entre elles, un diamètre de $200 \text{ \AA}$. Seules, quelques rares particules vides demeurent encore présentes, bien que des différences de densité soient facilement perceptibles entre plusieurs de ces particules (fig. 46 à 48). Ces différences, vis-à-vis du faisceau électronique, se remarque plus aisément dans les micrographies à faible grossissement (fig. 46 et 47) vu le contraste accru de l'optique électronique dans cette région. L'objectif du microscope était diaphragmé à 40 microns, sans égard aux grossissements utilisés.

Les figures 46 et 47 possèdent des formations se rapprochant clairement des enlignements rencontrés dans les ensembles paracrystallins. La perte de résolution causée par un trop grand contraste ne permet toutefois pas de distinguer la structure ou la forme du VDN.

Les plus forts grossissements des figures 48 et 49 nous permettent de voir aisément le contour hexagonal des particules virales, ce que les micrographies précédentes laissaient quelquefois entrevoir. Dans la figure 48, nous pouvons revoir des particules environ deux fois plus claires, et qui pourraient rendre, à cause d'une pénétration moins prononcée du phosphotungstate, l'image juxtaposée des deux faces de leurs hémisphères.

Nous pouvons voir à très fort grossissement (fig. 49), des particules pleines, vides, ainsi que des particules à centre clair, et d'autres dont la surface est partiellement dégarnie du revêtement de capsomères.

Résultats obtenus à partir de particules virales montées sur des trous-supports.

Afin de faciliter l'interprétation de l'ultrastructure d'un virus aussi petit que celui de la denso nucléose, nous avons monté une partie des échantillons purifiés, sur des membranes de carbone trouées (fig. 50). Ainsi, les particules virales ne reposent plus *sur une membrane support*, mais à *l'intérieur de trous* de dimensions très réduites. Nous pouvons ainsi nous débarrasser de la structure de la membrane de carbone, qui bien que dissociable des images propres à l'ultrastructure virale, demeure toujours gênante. De cette façon, seules la structure de l'agent contrastant (phosphotungstate) et celle du matériel protéique non dissocié par la purification, peuvent présenter des éléments structuraux étrangers. Ce sont ces deux derniers facteurs qui posent les limites de résolution lors de cette étude morphologique.

Une certaine déformation des particules virales peut être toutefois rencontrée, lorsque les trous-supports sont incomplètement remplis (fig. 51), ou lorsqu'une rétention s'est produite lors du séchage des préparations.

Nous avons obtenu des images différentes entre des particules de VDN montées sur membrane-support de carbone (fig. 55) et sur trous-supports (fig. 52). Ces deux micrographies représentent les plus grandes différences rencontrées. Les particules virales, observées sur la figure 55, présentent des capsomères à paroi mince, à l'intérieur desquels le phosphotungstate a bien pénétré. Montée sur trous-supports, la préparation virale se présente comme une couche extrêmement mince dont l'image disparaît complètement lors de l'observation au microscope électronique lorsque l'objectif est en foyer parfait. L'examen et l'enregistrement de l'image des virions retenus sur les trous-supports ont été faits au-dessous du foyer de l'objectif.

Morphologie des capsomères

Les capsomères de certaines particules étudiées montrent des contours hexagonaux, et d'autres, des contours pentagonaux.

Un capsomère au contour hexagonal peut être observé au centre de l'arête gauche du triangle schématisé de la figure 52. On peut aussi voir clairement un capsomère au contour hexagonal sur la particule en haut et à droite de la figure 42.

Nous pouvons retrouver des capsomères aux contours pentagonaux sur certaines particules du VDN. Le capsomère du sommet du triangle schématisé de la figure 53 en est un exemple.

La dimension de ces capsomères se situant à l'extrême limite de résolution de la coloration négative, les formes hexagonales et pentagonales ne sont pas toujours dissociables. De plus, afin de permettre une appréciation certaine, les capsomères doivent présenter clairement leur face à l'observateur et cette face doit être intimement entourée de l'agent contrastant.

Lorsque le contraste le permet, ces capsomères révèlent une structure creuse, et leur diamètre extérieur est d'environ $30 \text{ \AA}$. Le diamètre de l'orifice central aurait en moyenne $15 \text{ \AA}$. Leur longueur, mesurée sur la couronne de particules vides, varie entre 20 et $35 \text{ \AA}$. Ces mesures approximatives sont confirmées par le diamètre de $150 \text{ \AA}$ de la région opaque centrale de la particule. On obtient alors une longueur moyenne de $\frac{200 - 150}{2} = 25 \text{ \AA}$ pour chaque capsomère.

Disposition spatiale des capsomères

Nous avons observé, chez les particules virales de la densonucléose, la disposition de leurs capsomères en forme de triangles équilatéraux. Ces capsomères sont situés de la façon suivante sur chacun des triangles observés: chaque sommet possède un capsomère, et un capsomère est placé sur l'arête à distance égale des sommets (fig. 52 à 57).

La figure 52a contient deux particules virales, l'une vide et l'autre pleine. Nous pouvons voir un triangle délimité par des capsomères en surface de la particule pleine. Ce triangle est découpé sur la figure 52b et schématisé sur la figure 52c.

Le triangle, dont l'arête est formée de trois capsomères, reconnaissable sur la micrographie de la figure 53c, a également été isolé (fig. 53b) et schématisé (fig. 53d). Un des capsomères de l'arête inférieure est légèrement déplacé.

Un autre triangle peut être vu dans la figure 54.

Dans la figure 55, nous avons analysé une particule du VDN particulièrement bien contrastée par le phosphotungstate. Les capsomères de cette micrographie semblent toutefois

présenter des parois quelque peu amincies. Le capsomère au centre de l'arête gauche est déformé et déplacé.

Un des virions du groupe de la figure 56 présente aussi six capsomères disposés en forme de triangle.

Deux de ces triangles équilatéraux peuvent être étudiés sur la figure 57.

Le nombre total des capsomères peut être déterminé pour les virus cubiques, d'après la formule de Caspar et Klug (1962): $10 \times (n-1)^2 + 2$ où n est égal au nombre de capsomères disposés sur une arête, ce qui nous donne la somme de 42 capsomères pour le virus de la denso nucléose, soit $10 \times (3-1)^2 + 2 = 42$.

Superposition périodique, par rotation, des images du virus de la denso nucléose et de celles de son modèle.

Le modèle construit d'après les informations contenues dans les micrographies, se compose de 42 capsomères disposés sur les arêtes et les sommets d'un icosaèdre.

Nous avons photographié un icosaèdre puis le modèle de grandes dimensions du VDN. Nous avons pu photographier ces modèles sous 3 faces différentes qui se répètent lorsqu'on tourne ces formes géométriques sur elles-mêmes. Nous pouvons ainsi voir successivement des faces comportant 5 triangles équilatéraux formant un pentagone (fig. 58a et 59a), et chaque triangle équilatéral peut être mis en face de l'observateur (fig. 58b et 59b). De plus, une face composée de 2 triangles équilatéraux peut être également observée (fig. 58c et 59c).

Les schémas 60a, b et c correspondant à ces photographies, représentent la symétrie 5:3:2 qui se dégage des photographies des séries 58 et 59.

Afin de connaître les différentes images que pourrait livrer le modèle monté de capsomères, lors de la superposition périodique de ces éléments, nous avons effectué une série de rotations de ce modèle à diverses fractions du cercle.

Une série d'images réalisées par la superposition périodique de ce modèle composé de 42 capsomères a été réalisée et comparée aux images du virus de la denso nucléose obtenues en microscopie électronique.

Les résultats obtenus après les rotations du modèle et de la particule du VDN offrent une correspondance exacte. On peut voir deux exemples de ces rotations (fig. 61a,b; fig.62a,b).

Figure 33

Virus de la densonucléose. Particule pleine, particule vide et particules associées. Phosphotungstate à 2%, pH 6.5. Préparation par les méthodes rapides de diagnostic. 427,000 X.

Figure 34, 35 et 36

Méthode de centrifugation préparative. VDN et particules associées (fig. 34). 332,000 X; (fig. 35). 248,000 X; (fig. 36). 427,000 X.



Fig. 33



Fig. 34



Fig. 35



Fig. 36

Figures 37 et 38

VDN et particules associées, purifiés par centrifugation préparative. Ombrage au platine-carbone. Confirmation de la forme sphérique des particules (fig. 37). 78,400 X; (fig. 38). 213,500 X.



Fig. 37



Fig. 38

Figure 39

VDN purifié par centrifugation différentielle. On peut noter l'élimination des particules virales associées. Particules pleines et vides, ces dernières en forme de couronne formée de 12 capsomères (→). 258,000 X.

Figures 40 et 41

VDN purifié par centrifugation différentielle. Particules pleines et partiellement vidées (fig. 40 et 41). 427,000 X.

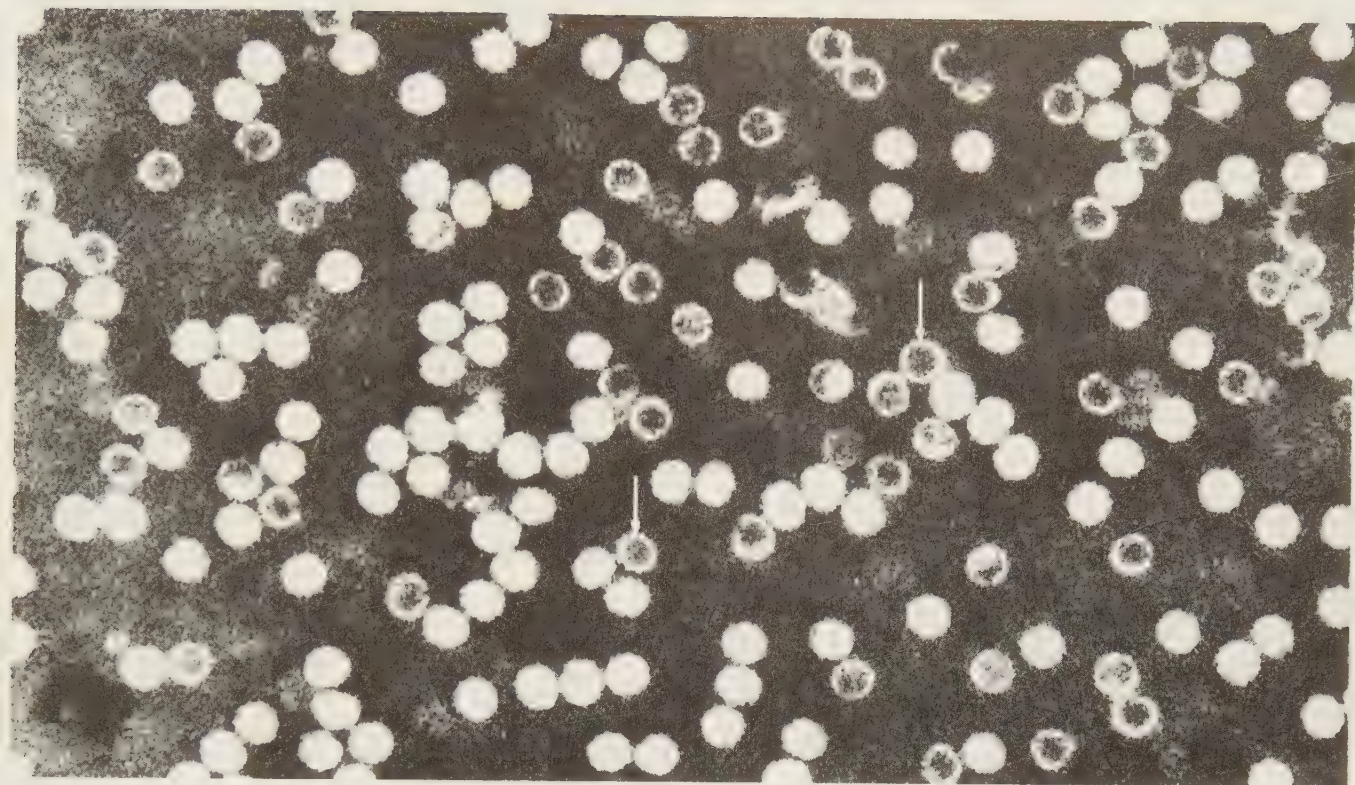


Fig. 39



Fig. 40



Fig. 41

Figures 42 et 43

VDN purifié par centrifugation différentielle. Particules pleines, vides et partiellement vides (fig. 42 et 43). 427,000 X.

Figures 44 et 45

Centrifugation différentielle. On peut noter une couronne périphérique transparente aux électrons dans le cas de quelques particules (fig. 44). 427,000 X; (fig. 45). 914,000 X.



Fig. 42

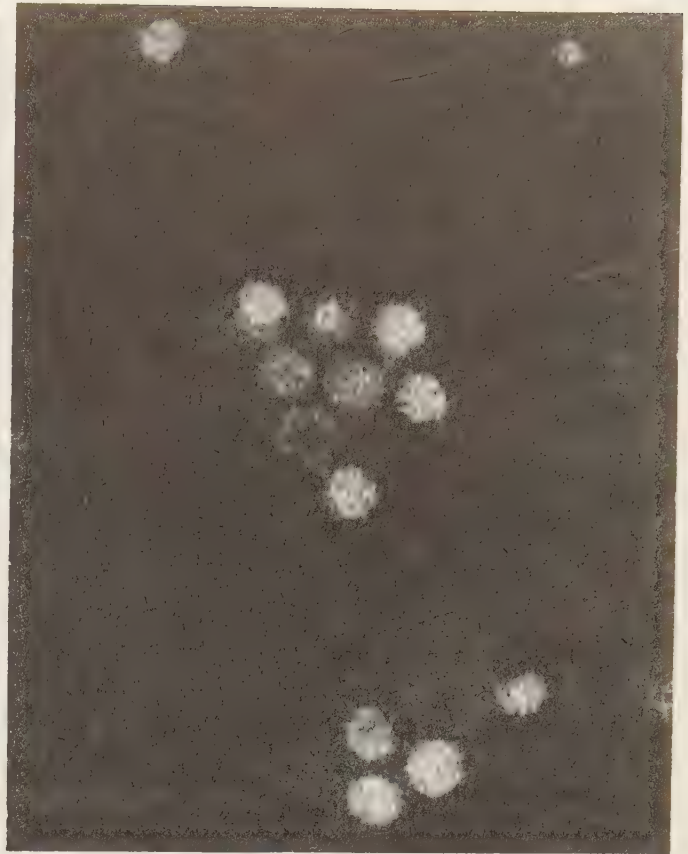


Fig. 43

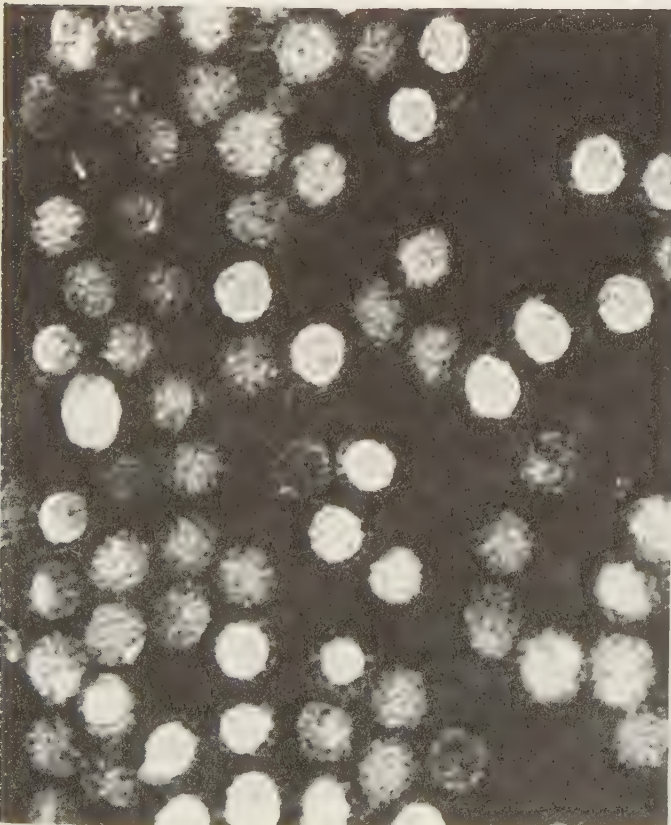


Fig. 44

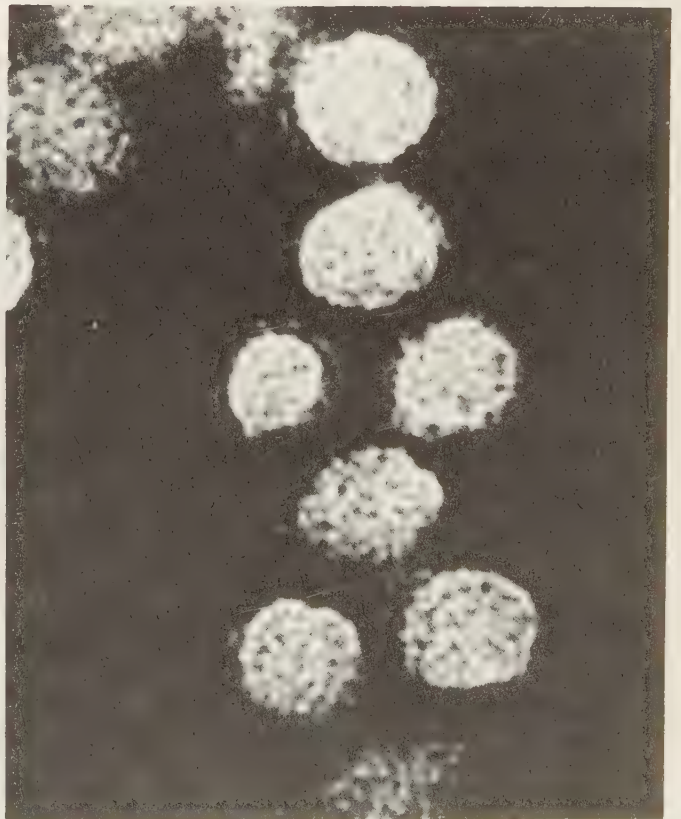


Fig. 45

Figures 46, 47 et 48

Virus de la denso nucléose purifié par centrifugation en gradient de densité en sucrose. Nous pouvons observer l'enlignement parfait des particules virales (fig. 46 et 47). 112,000 X; (fig. 48). 341,600 X.

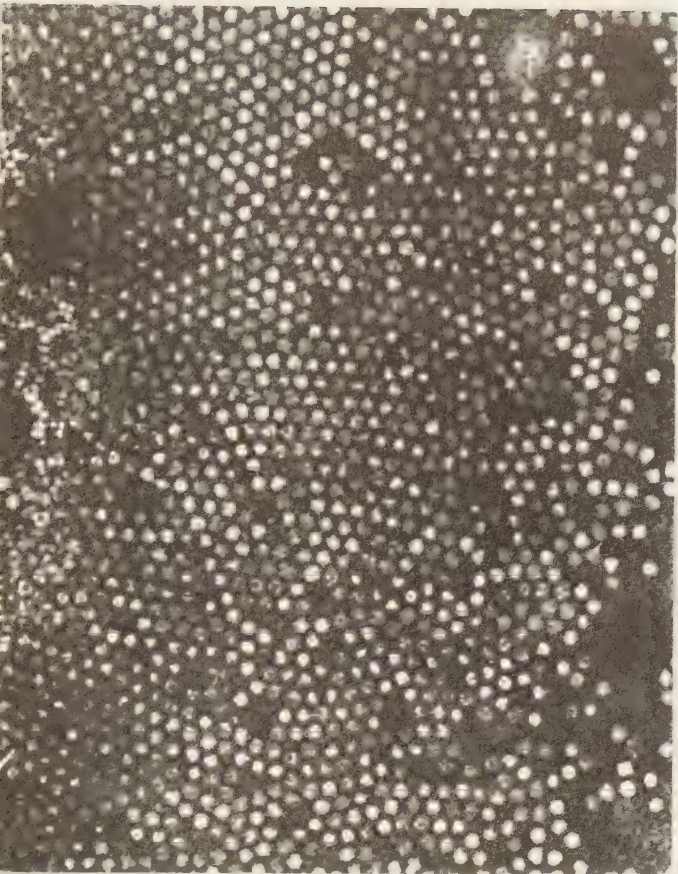


Fig. 46

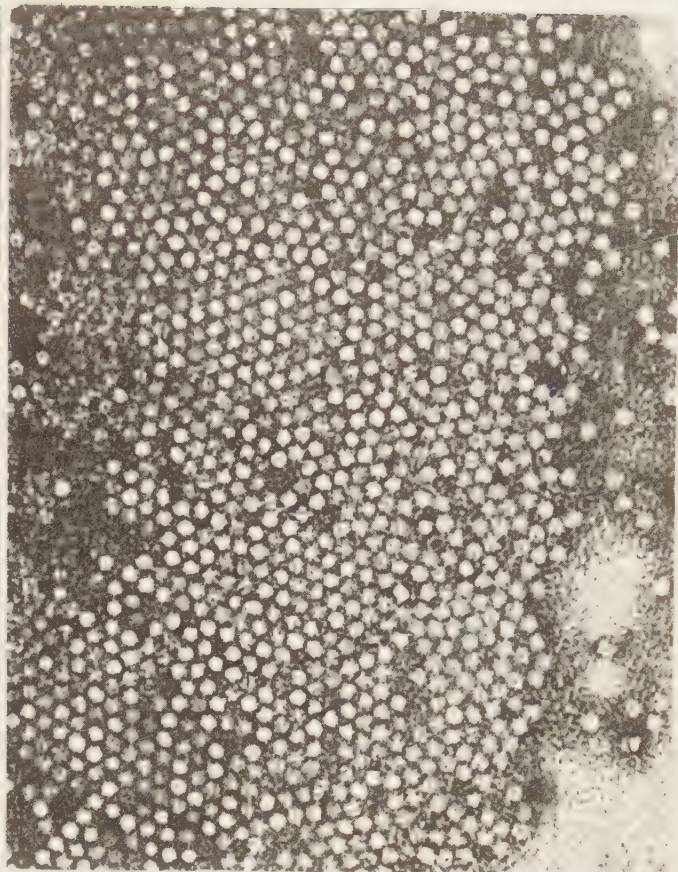


Fig. 47

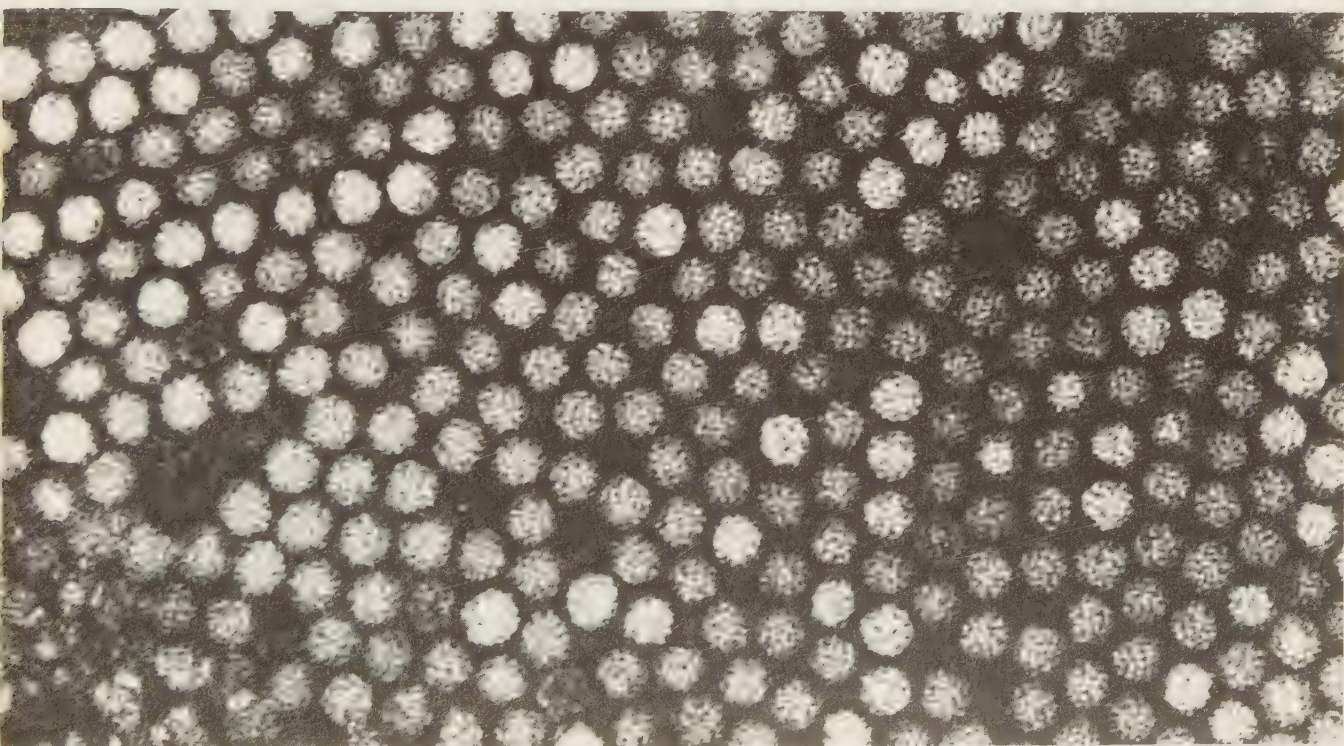


Fig. 48

Figure 49

VDN purifié par centrifugation en gradient de densité en sucrose. Particules virales à contour hexagonal (⟷). 548,000 X.

Figures 50 et 51

Montage des particules virales sur membranes trouées. Structure propre à la membrane de carbone (⟷) (fig. 50). 77,600 X.

Déformation des particules sur des trous-soutiens mal formés (fig. 51). 170,000 X.

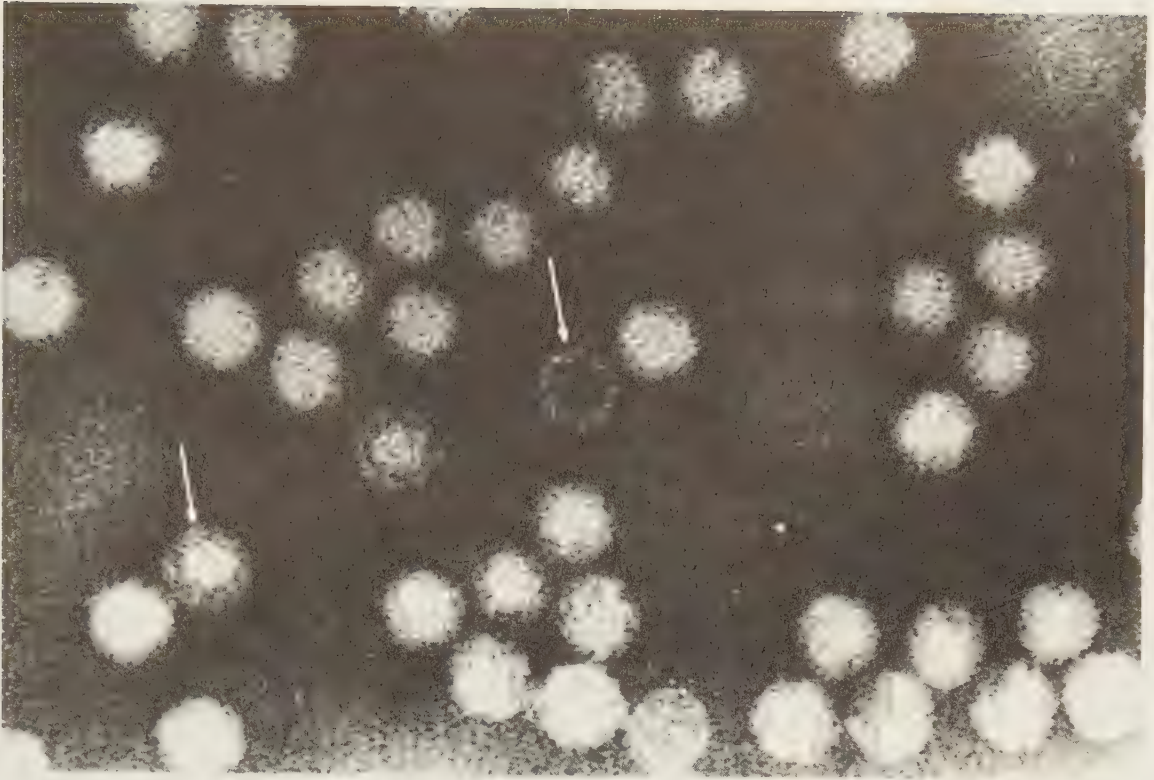


Fig. 49



Fig. 50



Fig. 51

Figure 52

VDN. 427,000 X.

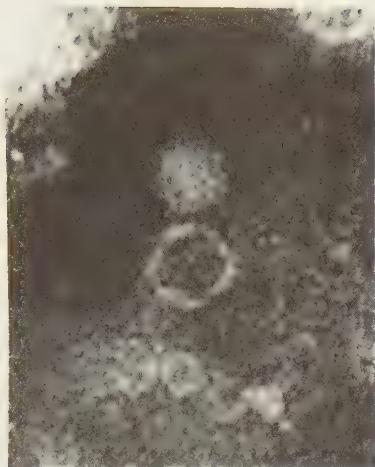
Figure 53

VDN. 727,000 X.

Figure 54

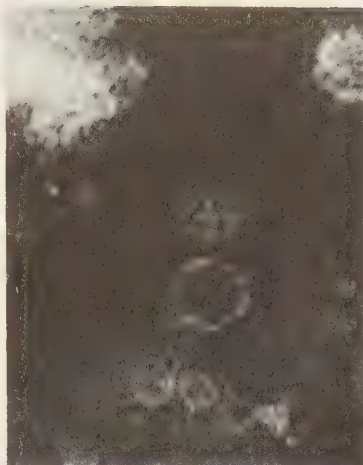
VDN. 727,000 X.

Résultats



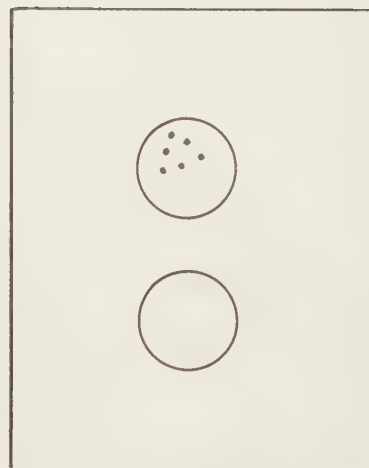
Micrographie
originale

Fig. 52a



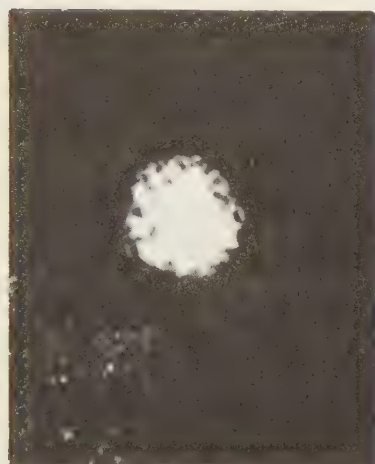
Micrographie
retouchée

Fig. 52b



Schéma

Fig. 52c



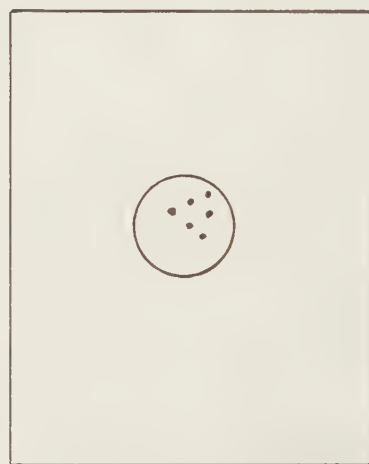
Micrographie
originale

Fig. 53a



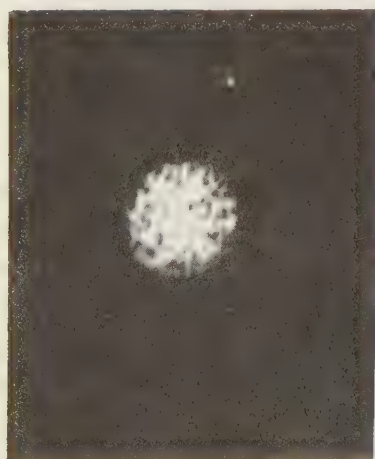
Micrographie
retouchée

Fig. 53b



Schéma

Fig. 53c



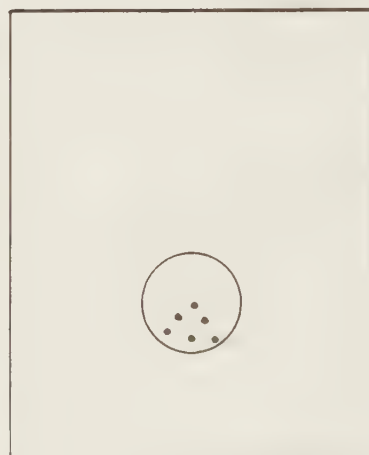
Micrographie
originale

Fig. 54a



Micrographie
retouchée

Fig. 54b



Schéma

Fig. 54c

Figure 55

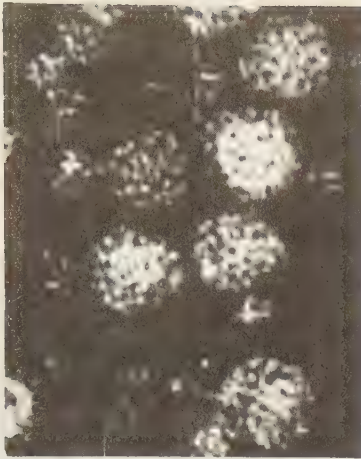
VDN. ~~341,600~~ X: 640,500

Figure 56

VDN. ~~640,500~~ X: 341,600

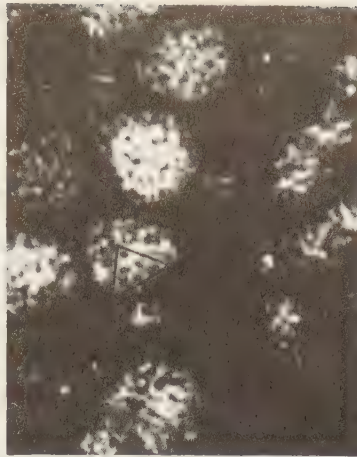
Figure 57

VDN. ~~727,000~~ X: 341,600



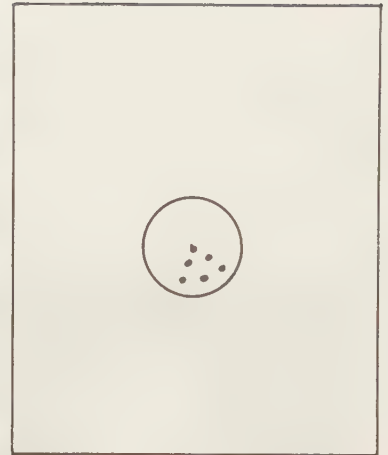
Micrographie
originale

Fig. 55a



Micrographie
retouchée

Fig. 55b



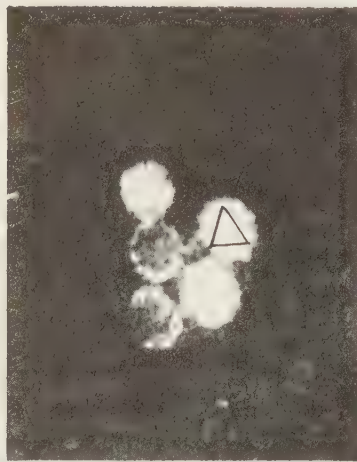
Schéma

Fig. 55c



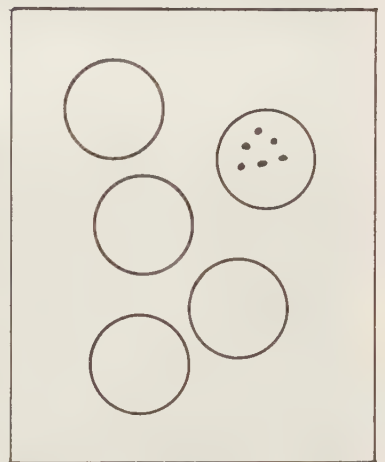
Micrographie
originale

Fig. 56a



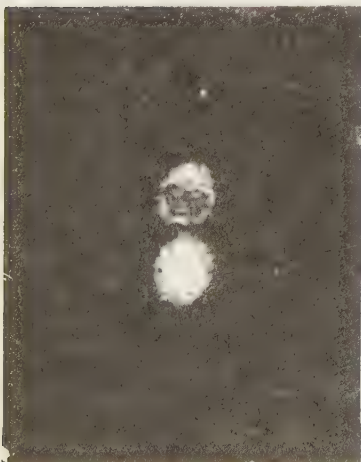
Micrographie
retouchée

Fig. 56b



Schéma

Fig. 56c



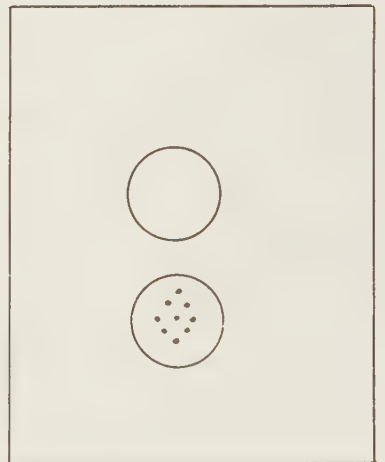
Micrographie
originale

Fig. 57a



Micrographie
retouchée

Fig. 57b



Schéma

Fig. 57c

Figure 58

Modèle icosaédrique.

Figure 59

Modèle icosaédrique formé de 42 capsomères.

Figure 60

Schéma.

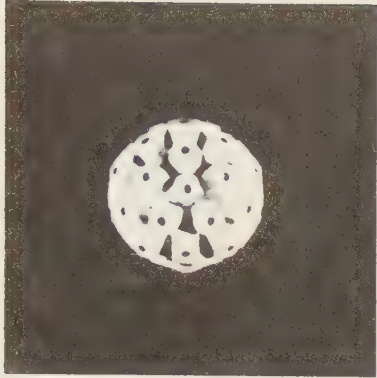


Fig. 58a

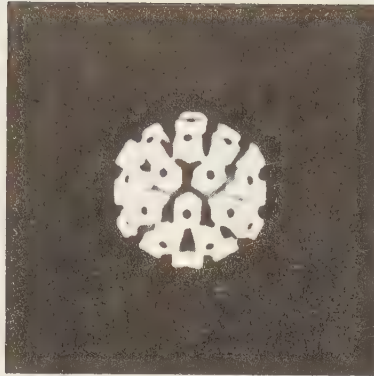


Fig. 58b

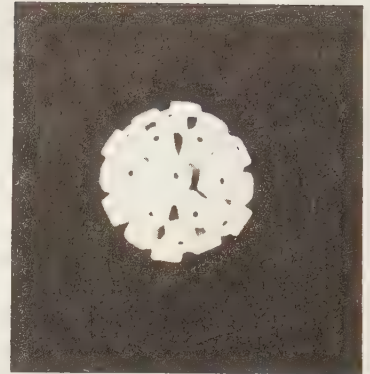


Fig. 58c

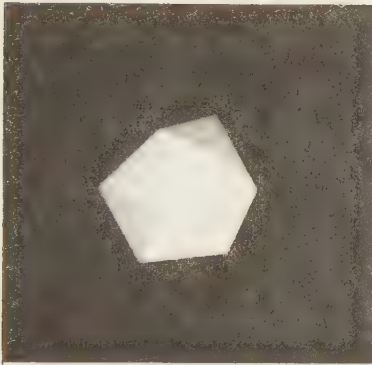


Fig. 59a

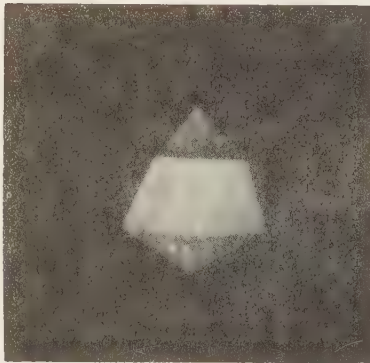


Fig. 59b

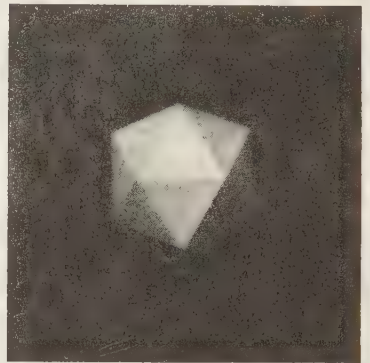


Fig. 59c

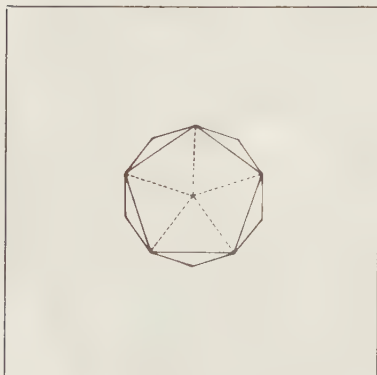


Fig. 60a

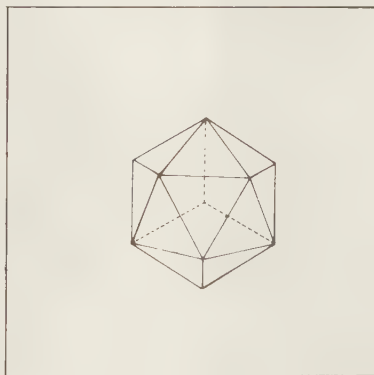


Fig. 60b



Fig. 60c

Figures 61 et 62

Superposition périodique d'images virales.

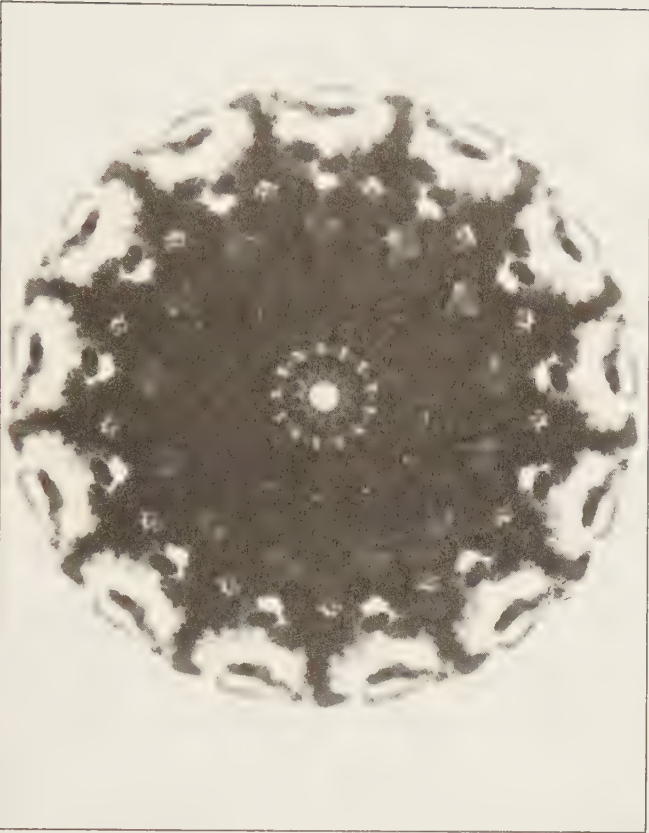


Fig. 61a



Fig. 61b

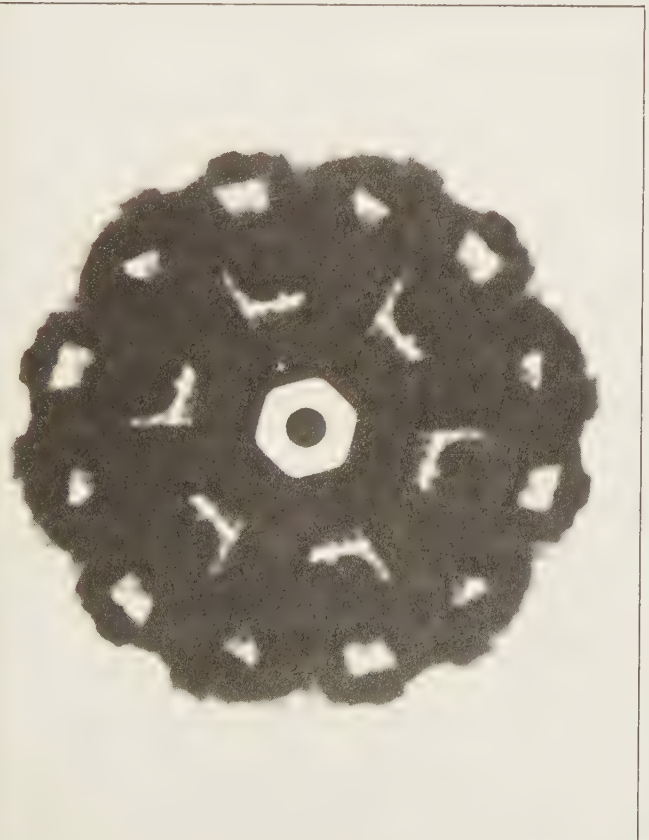


Fig. 62a

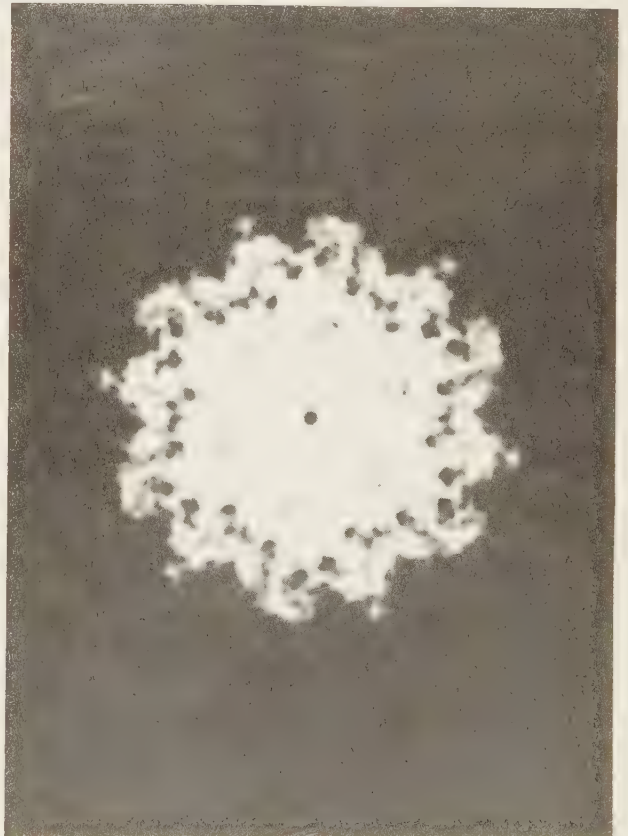


Fig. 62b

CHAPITRE V

DISCUSSION ET CONCLUSION

Nous avons étudié lors de ce travail, la réplication et la morphologie du virus de la denisonucléose chez son hôte d'origine les larves de *Galleria mellonella* Linn. (Lepidoptera).

Bien que presque tous les tissus de cette larve soient infectés (Kurstak et al., 1968), nous avons spécialement suivi, à l'aide du microscope électronique, la réplication du VDN au niveau des cellules de l'hypoderme et des glandes séricigènes. Nous avons utilisé parallèlement à la microscopie électronique, quelques méthodes complémentaires dont les résultats ont été observés en microscopie photonique, techniques d'immunofluorescence et d'immunoperoxydase, coloration à l'orangé d'acridine et réaction de Feulgen, digestions enzymatiques et autoradiographie. Mentionnons aussi que la microscopie en contraste de phase positif nous a servi d'intermédiaire entre la microscopie photonique et la microscopie électronique.

Nous n'avons mentionné que très brièvement dans ce travail, l'étude immunologique nécessaire à la production des immunsérums utilisés dans les méthodes d'immunofluorescence et d'immunoperoxydase. L'aspect immunologique de la denisonucléose sera traité lors d'un autre travail qui sera présenté prochainement à notre université.*

L'étude de l'ultrastructure du virus de la denisonucléose formait un autre chapitre de notre protocole. Nous avons utilisé dans ce but, diverses méthodes de concentration et de purification du VDN, ainsi que la coloration négative et l'ombrage des échantillons, afin d'obtenir le maximum d'information morphologique de ce virus. Ces données nous ont conduit à la construction d'un modèle morphologique de grand format du VDN.

Ces diverses techniques, appliquées à l'étude de la réplication et de la morphologie du virus de la denisonucléose, nous ont permis d'obtenir les résultats décrits au chapitre précédent. Nous avons confronté ces données avec celles publiées jusqu'ici, sur ce sujet, par d'autres auteurs. Cette comparaison nous permet de penser que nous avons apporté une contribution originale à la connaissance du virus de la denisonucléose.

■ ■ ■

Comme nous l'avons déjà cité dans la partie bibliographique de ce travail, l'étude de la pathogénèse du virus de la denisonucléose a été commencée par Meynadier et al. (1964)

* S. Belloncik, thèse de Docteur-Ingénieur, en préparation.

et par Vago et al. (1964) qui ont désigné cette maladie sous le nom de "*virose à noyaux denses*". Amargier (1966), lors d'une autre publication sur la pathogénèse de cette infection virale, au niveau de l'appareil séricigène, a fait connaître cette maladie sous le nom de "*densonucléose*". Ces auteurs avaient observé une "*hypertrophie monstrueuse*" (Vago et al., 1966) des noyaux pouvant atteindre "*6 à 10 fois leur volume initial*" à la fin de l'infection (Amargier, 1966).

Lors de notre étude de la réplication virale faite au microscope électronique, nous sommes restreints à l'examen des cellules de l'hypoderme et des glandes séricigènes. Durant les trois années où notre étude s'est poursuivie, nous avons comparé les résultats obtenus à partir d'une quantité considérable de larves infectées et saines. Le processus de réplication s'est avéré identique d'une expérience à l'autre.

L'étude en microscopie photonique et électronique a confirmé le site de réplication nucléaire du virus de la densonucléose. Ces deux méthodes de recherche utilisant des grossissements complémentaires, nous ont fourni des résultats équivalents, au moyen de techniques cytologiques, immunologiques et histochimiques.

Les colorations aux fluorochromes, comme l'orangé d'acridine, nous ont permis de suivre avec précision, grâce à cette technique spécifique de mise en évidence des acides nucléiques, l'apparition de l'ADN viral dans le noyau des cellules infectées et de confirmer (Truffaut et al., 1967) qu'il s'agissait de la réplication d'un ADN bicaténaire.

Des travaux, menés parallèlement avec la thymidine tritiée, nous ont permis d'observer l'incorporation de ce précurseur radioactif à l'ADN synthétisé au cours de l'infection. Cette technique d'autoradiographie appliquée au cours de notre étude au niveau de la microscopie photonique et de la microscopie électronique, a démontré une augmentation rapide de la synthèse de l'ADN dans les noyaux, dans les 2 premières heures de l'infection.

Plus tard, le noyau des cellules infectées s'hypertrophie et se dégrade à partir de sa périphérie. Le nucléoplasme est remplacé graduellement par les virions qui s'y répliquent (fig. 21). Ces résultats se comparent avec ceux de Vago et al. (1966) obtenus sur des cellules adipeuses infectées par le VDN. Ces auteurs ne semblent pas avoir observé au microscope électronique, des noyaux dont l'incidence de coupe aurait pu laisser voir la rupture de la membrane nucléaire.

Cette hypertrophie du noyau n'est pas la seule cause des grandes masses nucléaires observées en microscopie photonique. Nous avons pu observer, lorsque l'incidence des coupes fines nous l'a permis, le passage des virions dans le cytoplasme par l'ouverture créée lors de cette rupture de la membrane nucléaire. Cet envahissement du cytoplasme par les virions donne en microscopie photonique l'impression d'un noyau se gonflant à la grandeur de la cellule.

En plus de cette première donnée, inconnue jusqu'ici, nos micrographies électroniques révèlent une autre propriété du virus de la denso-nudéose, celle d'être en mesure de former dans les cellules, des ensembles paracrystallins dont Vago et al. (1966) avaient soupçonné l'existence lors de l'observation de *'limites rectilignes dénotant une tendance à l'organisation d'une forme de cristallisation'*. Nous pouvons examiner ces cristaux formés dans une cellule des glandes séricigènes (fig. 15), ainsi que dans le cytoplasme des cellules de l'hypoderme (fig. 16 et 17) au niveau de la rupture de la membrane nucléaire. La résistance présentée à l'invasion virale, par le matériel cytoplasmique, pourrait être la cause de l'entassement serré des virions et de leur cristallisation (fig. 16).

Certaines micrographies électroniques réalisées lors de l'étude de la réplication du VDN dans le noyau des cellules virosées, pourraient se rapprocher de celles obtenues par Tournier et al. (1961) lors de leur examen au microscope électronique des cellules de rein de Cercopithèque infectées in vitro par le virus SV 40. Leur exposé pourrait être repris en partie pour ce qui concerne la description de la réplication du VDN:.... *"Aux faibles grossissements, on remarque.... un éclaircissement net d'un certain nombre de noyaux avec margination de densification irrégulière de la chromatine. Le nombre de noyaux présentant un tel aspect augmente avec le temps. A plus fort grossissement, on constate dans la plupart de ces noyaux, la présence de très nombreuses particules de petite taille, et de densité moyenne. Dans les stades plus avancés leur nombre est parfois si élevé qu'elles peuvent emplir la totalité de l'espace nucléaire.... Elles sont remarquables par l'homogénéité de leur taille et de leur aspect. Elles ne présentent pas de membranes mais une mince couche externe peu dense et imprécise qui nous semble correspondre à la capside. Dans les noyaux où les particules sont très nombreuses, il n'est pas rare de les voir groupées en amas réguliers et symétriques évoquant une coupe de cristal"*. Ces auteurs ajoutent plus loin:... *"on ne peut manquer d'être frappé par la ressemblance existant entre les particules virales présentes dans les noyaux de cellules de rein de Cercopithèque infectées in vitro par le virus SV 40 et le virus du polyome de la souris"*.

On peut déduire de cette double comparaison que le mode de réplication du virus de la denso nucléose se rapproche par certains aspects, de celui d'un virus d'origine fort éloignée. Sa nature lytique et la très grande quantité de virions présents dans les cellules, vers la fin de sa réplication, permettent de suivre son développement, bien que la présence de particules virales soit difficile à déceler au tout début de l'infection. Leur très petite dimension se rapproche de celle de certains constituants cellulaires.

Les examens réalisés au microscope électronique lors de nos études sur la réplication du VDN au cours de ce travail, nous ont donné des images confirmant la correspondance entre les résultats obtenus par l'examen direct de particules virales purifiées, provenant de l'hémolymphe ou de broyat d'organes de larves infectées. Le nombre de particules virales révélés par les méthodes de diagnostic rapide en microscopie électronique, s'accroît parallèlement à la virémie détectée par les autres méthodes mentionnées.

Ces méthodes de diagnostic rapide, nous ont permis de révéler pour la première fois, la présence d'une particule virale associée (Kurstak et Côté, 1968b) que les techniques de purification avancée nous avaient fait ignorer. Cette particule associée au virus de la denso nucléose que nous avons pu étudier sur les figures 33 à 38, se rapproche des particules associées aux adenovirus, décrites par Melnick et al. (1965). Son image structurée laisse voir des sous-unités comparables aux capsomères des particules virales. Elles pourraient être un regroupement de capsomères détachés des particules mères, mais leur homogénéité laisse plutôt penser à une particule entièrement distincte. Une étude de leur caractérisation immunologique produirait des résultats de grand intérêt. Ce dernier sujet dépassant de loin les limites de notre protocole, nous avons laissé à d'autres la tâche de clarifier cette autre donnée originale de notre travail.

Les travaux de confirmation biologique et immunologique de cette particule associée sont en cours et d'après les résultats préliminaires (Kurstak et al., 1969, à paraître), il s'agirait effectivement du premier virus associé à un virus d'invertébrés, celui de la denso nucléose.

Nous avons étudié par tous les moyens dont nous disposons, la morphologie de la particule virale de la denso nucléose. Les virus, obtenus par les diverses méthodes de purification, observés au microscope électronique, nous ont fourni des résultats comparables

dont les différences peuvent être notées, sur les micrographies présentes dans cet ouvrage.

La première variante peut être remarquée dans la proportion entre les particules pleines et les particules vides. Nous avons noté que le nombre des particules vides augmentait proportionnellement avec le temps consacré à la préparation des échantillons. La conservation durant quelques semaines à une température de 4°C des échantillons purifiés du VDN, cause la disparition des particules pleines. On remarque, à ce moment sur le fond des préparations examinées au microscope électronique, un tapis de débris excessivement fins que la coloration négative rend blancs. L'importance de ce tapis étant inversement proportionnelle au nombre de particules virales pleines, nous nous sommes demandés si la pénétration du contrastant négatif ne serait pas causée par le détachement des sous-unités à la surface des particules virales qui aurait préalablement facilité la perte de l'acide désoxyribonucléique viral formant le noyau des particules pleines. Cette dégradation des particules virales est très minime, lorsque le VDN a été conservé à -70°C .

La deuxième variante ne nous a pas semblé significative puisqu'elle n'a été rencontrée que sur un seul groupe de larves. Nous l'avons quand même rapportée. Il s'agit des images du VDN enregistrées dans les fig. 44 et 45. Certains virus observés dans l'hémolymphe des larves infectées possèdent un centre clair et une couronne structurée se rapprochant de celles des particules vides. Nous n'avons pas réussi à purifier suffisamment ces lots de VDN pour les débarrasser d'une substance non identifiée qui a interféré dans la réalisation des micrographies à haute résolution.

Les diverses méthodes de préparation des virions lors de leur purification et lors de leur montage sur les membranes-support, peuvent également provoquer des différences dans l'image de l'ultrastructure particulière. L'interstice entre les capsomères, et le puits central de ces sous-unités virales, peuvent laisser pénétrer plus ou moins bien le phosphotungstate utilisé pour leur mise en évidence. L'enlignement serré des virus (fig. 48) ou leur dispersion sur une certaine surface de la membrane-support (fig. 49) provoquent également des images où l'on peut distinguer plus ou moins facilement l'ultrastructure du VDN.

La limite de résolution des détails structuraux n'est pas due au microscope électronique mais aux possibilités des techniques assurant à ces détails morphologiques le contraste nécessaire à leur visualisation. Nous avons éliminé les particules contrastées au zirconium (table XIV), et n'avons retenu que les images du VDN préparé par l'acide phosphotungstique. Le grain très fin du zirconium permettra bientôt d'obtenir des images offrant une résolution améliorée. Le contraste obtenu par cette nouvelle coloration est malheureusement très faible. Des essais récents permettent toutefois de penser que très prochainement les limites actuelles de résolution et de contraste seront repoussées.

L'ombrage au platine-carbone a confirmé la symétrie cubique du virus de la densonucléose par la projection de la hauteur de cette particule. La pauvre résolution de cette technique vis-à-vis un virus aussi petit ne pouvait cependant pas apporter des données très détaillées.

La coloration négative, bien que produisant des images à deux dimensions, nous a permis d'étudier plus profondément la morphologie du VDN. Les contours sphériques des images ombrées, sont apparus hexagonaux en coloration négative (fig. 49), démontrant que nous étions en présence d'un polyèdre et que, selon l'étude élaborée de Caspar et Klug (1962) sur les formes géométriques virales possibles, nous pouvions classer le VDN parmi les icosaèdres, forme que Vago et al. (1964) proposaient comme probable.

Nous avons retracé les formes triangulées de l'icosaèdre dans la configuration offerte par le groupement des capsomères. Sur plusieurs de nos micrographies, nous pouvons distinguer clairement à la surface du VDN des unités correspondant à la définition classique des capsomères, et 6 de ces derniers sont disposés sur trois arêtes offrant ainsi l'image d'un triangle équilatéral. Lorsque nous pouvons identifier l'arête commune de deux triangles (fig. 57) et compter les capsomères de 5 arêtes, nous retrouvons le nombre de capsomères nécessaires aux exigences de la géométrie des virus icosaédriques (Caspar et Klug, 1962).

Les 12 capsomères disposés en cadran d'horloge et formant la couronne des particules vides (fig. 39) nous ont fourni une indication supplémentaire renforçant les probabilités du nombre de 42 capsomères pour l'ensemble de la particule. Comme nous l'avons également vu dans les résultats de cet ouvrage, le modèle icosaédrique formé de 42 capsomères rend en photographie cette couronne de 12 capsomères que le VDN offre en microscopie électronique.

Nous n'avons pas réussi, par les techniques utilisées dans ce travail, à éclaircir parfaitement la morphologie des capsomères du virus de la densonucléose. Les dimensions de leur orifice central d'environ $15 \text{ \AA}$ se situent à l'extrême limite des possibilités de la coloration négative. Certains de ces capsomères (fig. 52) offrent sur leur margelle, des zones de densité variable suggérant autant de constituants groupés en forme de tubes hexagonaux ou pentagonaux. Cette hypothèse se voit renforcée par l'absence d'un ou de plusieurs côtés chez plusieurs capsomères (fig. 52 à 57).

La densonucléose se range à part, parmi les infections virales des invertébrés par ses caractères pathogéniques. Vago et al. (1964) faisaient remarquer: "*nous nous trouvons en face d'une maladie à virus d'un type nouveau, dont l'agent ne peut être rangé dans le cadre actuel des virus connus chez les invertébrés*". Les récentes données concernant ce virus démontrant qu'il se réplique également dans les cellules des vertébrés (Kurstak et al., Science, sous presse), appuient cette hypothèse.

Une classification des virus, qui, au lieu de tenir uniquement compte de l'hôte d'origine, engloberait l'ensemble des données comparables entre les virus des vertébrés, des invertébrés et des plantes, faciliterait l'addition de virus nouveaux, tel celui de la densonucléose.

Dans un travail récent, Kurstak et Côté (1969) proposaient de classer le VDN dans le système L.H.T. (Lwoff et Tournier, 1966). Les résultats concernant la morphologie du virus de la densonucléose, décrits dans le chapitre précédent, ajoutés à ceux des ouvrages cités dans la partie bibliographique de ce travail, permettraient de classer le VDN dans le tableau général des virus, comme une nouvelle famille, celle des Densoviridae, qui serait placée entre les familles de Parvoviridae et de Papilloviridae.

<i>Phylum</i>	<i>Subphyla</i>	<i>Classes</i>	<i>Ordre</i>	<i>Famille</i>
Vira	DNA Deoxyvira	C Deoxycubica	N Haplovirales	4-42 Densoviridae
	<i>Genre</i>	<i>Espèce type</i>	<i>Nom commun</i>	
	Densovirus	Galleria	Virus de la densonucléose (VDN) Densonucleosis virus (DNV)	

En conclusion, nous espérons que les données nouvelles apportées par ce travail, seront acceptées comme une contribution aux connaissances déjà acquises par d'autres auteurs sur le virus de la densonucléose et qu'elles pourront être utiles à d'autres chercheurs intéressés aux virus d'invertébrés et à la virologie comparée.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, J.R., Wilcox, T.A., 1966. Pathogenesis of nuclear polyhedrosis viruses in several insect studies. *Proc. 6th Intern. Congr. Electron Microscopy*, Kyoto, 2: 159-160.
- Adams, J.R., Wallis, R.L., Wilcox, T.A., Faust, R.M., 1968. A previously undescribed polyhedrosis of the zebra caterpillar *Ceramica picta*. *J. Invert. Pathol.*, 11: 45-58.
- Agrawal, H.D., Kent, J.W., MacKay, D.M., 1965. Rotation technique in electron microscopy of viruses. *Science*, 148: 638.
- Aizawa, K., Jida, S., 1963. Nucleic acids extracted from the polyhedra of the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Insect Pathol.*, 5: 344-348.
- Aizawa, K., Vago, C., 1959. Culture "in vitro" de cellules séparées de tissus d'insectes. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 249: 928-930.
- Almeida, J., 1963. A classification of virus particles based on morphology. *J. can. med. Ass.*, 89: 787-798.
- Almeida, J., Howatson, A.F., 1962. Substructure of viruses within cells studied by negative staining. *Proc. 5th Intern. Congr. Electron Microscopy*, 2: MM4. Academic Press, New-York.
- Amargier, A., 1966. Action de la densonucléose du Lépidoptère *G. mellonella* L. sur la sécrétion et l'émission de substance séricigène. *Arch. ges. Virusforsch.*, 15: 659-667.
- Amargier, A., Vago, C., Meynadier, G., 1964. Etude histopathologique de la virose à fuseaux chez le Coléoptère *Melolontha melolontha*. *Mikrosk.*, 19: 309-315.
- Amargier, A., Vago, C., Meynadier, G., 1965. Etude histopathologique d'un nouveau type de virose mise en évidence chez le Lépidoptère *G. mellonella* L. *Arch. ges. Virusforsch.*, 15: 659-667.
- Anderson, T.F., 1956. Electron microscopy of microorganisms. In *Physical techniques in biological research*, 3: 177-237. Academic Press, New-York, 728 p.

- Armstrong, J.S., 1956. Histochemical differentiation of nucleic acids by means of induced fluorescence. *Exp. Cell Res.*, 2: 640.
- Arnott, J.H., Smith, K.M., 1968. An ultrastructural study of the development of a granulosis virus in the cells of the moth *Plodia interpunctella* Hbn. *J. Ultrastruct. Res.*, 21: 251-268.
- Arnott, H.J., Smith, K.M., Fullilove, S.L., 1968. Ultrastructure of a cytoplasmic polyhedrosis virus affecting the Monarch Butterfly *Danaus plexippus*. *J. Ultrastruct. Res.*, 24: 479-507.
- Aruga, H., Israngkul, A., 1961. Studies on the size of cytoplasmic polyhedra of the silkworm *Bombyx mori* L. *J. Sericult. Sci., Japon*, 30: 119-125.
- Atchison, R.W., Castro, B.C., Hammon, W.M., 1965. Adenovirus-associated defective virus particles. *Science*, 149: 754-755.
- Avrameas, S., Uriel, J., 1966. Méthode de marquage d'antigènes et d'anticorps avec des enzymes et son application en immunodiffusion. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 262: 2543-2545.
- Avrameas, S., Bouteille, M., 1968. Ultrastructural localization of antibody by antigen label with peroxydase. *Exp. Cell Res.*, 53: 166-176.
- Backus, R.C., Williams, R.C., 1950. The use of spraying methods and of volatile suspending media in the preparation of specimens for electron microscopy. *J. appl. Phys.*, 21: 11.
- Bailey, L., Gibbs, A.J., Woods, B.D., 1963. Two viruses from adult honey bees *Apis mellifera* Linn. *Virology*, 21: 390-395.
- Bailey, L., Gibbs, A.J., 1964. Infection of bees with acute paralysis virus. *J. Insect Pathol.*, 6: 395-407.
- Bailey, L., Gibbs, A.J., Woods, R.D., 1964. Sacbrood virus of the larval Honey Bee *Apis mellifera* Linn. *Virology*, 23: 425-429.

- Barigozzi, C., (éd.), 1968. *Secondo Colloquio Internazionale Sulle Culture di Tessuto Degli Invertebrati*. Istituto Lombardo Sci., 9-10 Settembre 1967, Milano, 274 p.
- Beck, S.D., 1960. Growth and development of the greater wax moth *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera). *Wisconsin Acad. Sci.*, 49: 138-148.
- Behnke, O., 1969. Demonstration of endogenous peroxidase activity in the electron microscope. *J. Histochem. Cytochem.*, 17: 62-65.
- Bellet, A.J.D., 1968. The iridescent virus groups. *Adv. Virus Res.*, 13: 225-246.
- Bellet, A.J.D., Inman, R.B., 1967. Some properties of deoxyribonucleic acids preparations from *Chilo*, *Sericesthis* and *Tipula* iridescent viruses. *J. mol. Biol.*, 25: 425-432.
- Bergoin, M., Devauchelle, G., Duthoit, J.L., Vago, C., 1968. Etude au microscope électronique des inclusions de la virose à fuseaux chez les Coléoptères. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 266: 2126.
- Bergold, G.H., 1947. Die Isolierung des Polyeder-Virus und die Natur der Polyeder. *Z. Naturforsch.*, 2B: 122-143.
- Bergold, G.H., 1948. Über die Kapselvirus-Krankheit. *Z. Naturforsch.*, 3B: 338-348.
- Bergold, G.H., 1963. The molecular structure of some insect virus inclusions bodies. *J. Ultrastruct. Res.*, 8: 360-378.
- Bergold, G.H., 1964. Insect viruses. In *Technique in experimental virology*, 111-144. Harris, éd., Academic Press, New-York, 480 p.
- Bergold, G.H., Friedrich-Frekka, H., 1947. The size and serology of *Bombyx mori* polyhedral virus. *Z. Naturforsch.*, 2B: 410.
- Berkaloff, A., Bregliano, J.C., Ohanessian, A., 1965. Mise en évidence de virions dans des *Drosophiles* infectées par le virus héréditaire. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 260: 5955-5959.

- Bernhard, W., Tournier, P., 1962. Ultrastructural cytochemistry applied to the study of virus infection. *Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology*, 28: 67-82.
- Bird, F.T., 1962. On the development of the *Tipula iridescent* virus particule. *Can. J. Microbiol.*, 8: 533-535.
- Bird, F.T., 1963. On the development of granulosis virus. *J. Insect Pathol.*, 5: 368-376.
- Bird, F.T., 1964. On the development of insect polyhedrosis and granulosis virus particles. *Can. J. Microbiol.*, 10: 49-52.
- Brachet, J., 1940. La détection histochimique des acides pentosenucléiques. *C.R. Soc. Biol., Paris*, 133: 88.
- Bradley, D.E., 1954. Evaporated carbon films for use in electron microscopy. *Brit. J. appl. Phys.*, 5: 65.
- Brakke, M.K., 1967. Density gradient centrifugation. In *Methods in Virology* 2: 93-117. Maramorosch et Koprowski, éd., Academic Press, New-York, 682 p.
- Brcak, J., Kralik, O., 1965. On structure of the virus causing Sacbrood of the honeybee. *J. Invert. Pathol.*, 7: 110-111.
- Brenner, S., Horne, R.W., 1959. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Bioch. biophys. Acta*, 34: 104-110.
- Brogie de, L., 1924. Thèse, Université de Paris. D'après Freundlich, M.M., 1963, Origin of the electron microscope. *Science*, 142: 185-188.
- Burnside, C.E., 1945. The cause of paralysis of honey bees. *Am. Bee J.*, 85: 354-355.
- Carasso, N., Fayard, P., Oberlin, A., 1961. Biocristallographie. In *Traité de microscopie électronique*, 2: 1121-1206, Hermann, Paris, 1300 p.
- Caspar, D.L.D., 1965. Design principles in virus particule construction. In *Viral and Rickettial infection of man*, 51-93, Lippinott, éd., Philadelphie.

- Caspar, D.L.D., 1966. An analogue for negative staining. *J. mol. Biol.*, 15: 365-371.
- Caspar, D.L.D., Klug, A., 1962. Physical principles in the construction of regular viruses. *Symp. quant. Biol.*, 27: 1-24.
- Clark, T.B., Kellen, W.B., Lum, P.T.M., 1965. A mosquito iridescent virus (MIV) from *Aedes taeniorhynchus* Wied. *J. Invert. Pathol.*, 7: 519-520.
- Coons, A.H., Creech, H.J., Jones, R.N., 1941. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc. Soc. exp. Biol.*, 47: 200-202.
- Cornalia, E., 1856. Monografia del bombice del gelso. *Mem. l Istituto Lombardo Sci.*, 348-351.
- Crick, F.H.C., Watson, J.D., 1956. Structure of small viruses. *Nature*, 177: 473.
- Culling, C., Vassar, P., 1961. Deoxyribose nucleic acid. A fluorescent histochemical technique. *Arch. Path.*, 71: 76-92,
- Day, M.F., Mercer, E.H., 1964. Properties of an iridescent virus from the beetle *Sericesthis pruinosa*. *Australian J. biol. Sci.*, 17: 892-902.
- Dart, L., Turner, T.R., 1959. Fluorescence microscopy in ex foliative cytology. *Lab. Invest.*, 8: 1513-1522.
- Dixon, M., Web, E., 1964. *Enzymes*. Longmans, Londres, 980 p.
- Doane, F.W., 1969. 1st Intern. Congr. Virology, Helsinki, 1968. *Prog. med. Virol.*, (sous presse).
- Doane, F.W., Anderson, N., Rhodes, A.J., 1968. The importance of electron microscopy in diagnostic virology. *Can. J. public Health*, 59: 34.
- Echlin, P., 1964. Intracytoplasmic membraneous inclusion in the blue-green Alga onacystis midulons. *Arch. Mikrobiol.*, 49: 267-274.
- Enders, J.F., Waler, Th., Robbins, F.C., 1949. Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues. *Science*, 109: 85-87.

- Epstein, M.A., Holt, S.J., 1958. Observations on the Rous virus: Integrated electron microscopical and cytochemical studies of fluorocarbon purified preparations. *Brit. J. Cancer*, 12: 363-369.
- Epstein, M.A., 1958. Composition of the Rous virus nucleoid. *Nature*, 181: 1808.
- Faulkner, P., 1964. Isolation and analysis of ribonucleic acid from inclusion bodies of the nuclear polyhedrosis of the silkworm. *Virology*, 16: 479-484.
- Fayet, M.T., Mackowiak, C., Comand, R., Leftheriotis, E., 1957. Etude comparative du virus de la fibromatose et de la myxomatose. 1- Etude sérologique par la méthode d'Ouchterlony. *Ann. Inst. Pasteur*, 92: 426-472.
- Fayet, M.T., Poncet, G., 1958. Immuno-électrophorèse appliquée au virus aphteux. *Ann. Inst. Pasteur*, 94: 732-738.
- Fenner, F., 1968. The biology of animal viruses. 1- *Molecular and cellular biology*, 1-474. Academic Press, New-York.
- Fenner, F., 1968. The biology of animal viruses. II- *The pathogenesis of viral infections*, 475-845. Academic Press, New-York.
- Feulgen, R., Rossenbeck, H., 1924. Nachweis einer Nucleinsäure von typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zell-Kernen in mikroskopischen Präparation. *Z. Phys. Chem.*, 155: 203-248.
- Finch, J.T., Holmes, K.C., 1967. Structural Studies of viruses. In *Methods in Virology*, 3: 351-474. Maramorosch et Koprowski, éd., Academic Press, New-York. 658 p.
- Fosset, J., Chastang, S., 1963. L'élevage aseptique d'insectes, complément d'un service de culture de tissus. *Ann. Epiph.*, 14: 35-38.
- Garzon, S., Kurstak, E., 1968. Infection des cellules des gonades et du système nerveux de *Galleria mellonella* L. par le virus de la denso nucléose. *Naturaliste can.*, 95: 1125-1129.

- Gaulden, M.E., Carlson, J.G., 1951. Cytological effects of colchine on the grasshopper neuroblast in vitro, with special reference to the origin of the spindle. *Exp. Cell Res.*, 2: 416.
- Gendon, Y.A., 1958. Study of the specific antibody content of the individual protein fractions of anti-influenzal horse serum. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, 2: 408-414.
- Glaser, R.W., Stanley, W.M., 1943. Biochemical studies on the virus and the inclusion bodies of silkworm jaundice. *J. exp. Med.*, 77: 451.
- Glauert, A., 1965. Section staining cytology., autoradiography and immunochemistry for biological specimens. In *Techniques for electron microscopy*, Blackwell, Oxford, 560 p.
- Goring, I., 1968. Contribution à l'étude de la pathogénèse du virus de la densonucléose. *Thèse, Faculté de Médecine, Université de Montréal.*
- Grabar, P., 1957. Agar-gel diffusion and immunoelectrophoretic analysis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 69: 591-607.
- Grabar, P., 1960. La méthode d'analyse immuno-électrophorétique. Applications aux liquides biologiques humains. 5-31. Masson, Paris.
- Grabar, P., Williams, C.A., 1953. Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Applications au sérum sanguin. *Biochem. biophys. Acta*, 10: 193-194.
- Grace, T.D.C., 1962. Establishment of four strains of cells from insect tissue grown in vitro. *Nature*, 195: 788-789.
- Grace, T.D.C., May, M.F., 1963. Continuous culture of insect tissues. *Ann. Epiph.*, 14: 27-28.

- Graham, R., Karnovsky, M., 1966. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney. Ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.*, 14: 291-301.
- Granboulan, N., Tournier, P., 1965. Horaire et localisation de la synthèse des acides nucléiques pendant la phase d'éclipse du virus SV40. *Ann. Inst. Pasteur*, 109: 837-853.
- Granboulan, P., 1965. Comparison of emulsions and techniques in electron microscope radioautography. 43-63. In *The use of radioautography in investigating protein synthesis*. Leblond et Warrens, éd., Academic Press, New-York, 348 p.
- Hall, C.E., 1956. Method for the observation of macromolecules with the electron microscope, illustrated with micrographs of DNA. *J. biophys. biochem. Cytol.*, 2: 625-628.
- Heimpel, A.M., Adams, J.R., 1966. A new nuclear polyhedrosis of the Cabbage Looper *Trichoplusea ni*. *J. Invert. Pathol.*, 8: 340-346.
- Horne, R.W., 1963. The structure of viruses. *Sci. Am.*, 208: 48-56.
- Horne, R.W., 1967. Electron microscopy of isolated virus particles and thin components. In *Methods in virology*, 3: 521-574., Maramorosch et Koprowski, éd., Academic Press, New-York, 658 p.
- Hosaka, Y., Aizawa, K., 1964. The fine structure of the cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm *Bombyx mori* Linn. *J. Insect Pathol.*, 6: 53-77.
- Huger, A., 1963. Granulose of insects. In *Insect Pathology*, 1: 531-575 Steinhaus, éd., Academic Press, New-York, 661 p.
- Humason, G.L., 1967. *Animal tissue techniques*. Freeman and Co., San Francisco, 567 p.
- Hurpin, B., Vago, C., 1963. Une maladie à inclusions cytoplasmiques fusiformes chez le coléoptère *Melolontha melolontha* Linn. *Rev. Pathol. vég. Entomol. Agr. France*, 42: 115-117.

- Huxley, H.E., 1957. Some observations on the structure of tobacco mosaic virus.
In *Proc. Stockholm Conf. Electron Microscopy, 1956*, 260, Almqvist et Wiksel, Stockholm.
- Huxley, H.E., Zubay, G., 1960. Electron microscope observations on the structure of microsomal particles from *Echerichia Coli*. *J. mol. Biol.*, 2: 10-18.
- Ishimori, J., 1934. Contribution à l'étude de la grasserie du ver à soie *Bombyx mori*.
C.R. Soc. Biol., Paris, 116: 1169.
- Kasten, F., Burton, V., 1959. A modified Schiff solution. *Stain Technol.*, 34: 289.
- Kawase, S., 1967. Ribonucleic acid extracted from the cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm *Bombyx mori*. *J. Invert. Pathol.*, 9: 136-138.
- Kellenberger, E., Schwab, W., Ryter, A. L'utilisation d'un copolymère du groupe des polyesters comme matériel d'inclusion en ultramicrotomie. *Experientia*, 12: 521.
- Kirby, W., Spence, W., 1826. Diseases of insects. In *Introduction to entomology, or, Elements of the natural history of insects*. 4: 197-232. Longmans, Londres.
- Kleinschmidt, A., Lang, D., Zahn, R.K., 1961. Über die intrazelluläre Formation von bakterien DNS. *Z. Naturforsch.*, 16B: 730-739.
- Knoll, M., Ruska, E., 1931. The electron microscope. *Z. tech. Phys.*, 12: 394
- Knoll, M., Ruska, E., 1932a. Contribution to geometrical electron optics. *Ann. Phys.*, (5), 12: 607.
- Knoll, M., Ruska, E., 1932b. The electron microscope. *Z. Phys.*, 78: 318.
- Komarek, J., Briendl, B., 1924. Die Wipfelkrankheit der Nonne und der Erreger derselben. *Z. Entomol.*, 10: 99-162.
- Kurstak, E., 1967. Paramètres influençant le développement du virus polyédrique cytoplasmique intestinal de *Mamestra brassicae* L. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 264: 507-510.
- Kurstak, E., Côté, J.R., 1968a. Morphologie du virus de la densonucléose purifié par centrifugation en gradient de densité. *Rev. can. Biol.*, 27: 83-87.

- Kurstak, E., Côté, J.R., 1968b. Présence de particules associées avec le virus à ADN de la denisonucléose (VDN) chez un invertébré. *Rev. can. Biol.*, 27: 357-359.
- Kurstak, E., Côté, J.R., 1969. Proposition de classification du virus de la denisonucléose (VDN) basée sur l'étude de la structure moléculaire et des propriétés physico-chimiques. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 268: 616-619.
- Kurstak, E., Stanislawski-Birencwajg, M., 1968. Localisation du matériel antigénique du virus de la denisonucléose au cours de l'infection chez *Galleria mellonella* L. *Can. J. Microbiol.*, 14: 1350-1352.
- Kurstak, E., Vago, C., 1967. Transmission du virus de la denisonucléose par le parasitisme d'un Hyménoptère. *Rev. can. Biol.*, 26: 311-316.
- Kurstak, E., Côté, J.R., Sonea, S., 1968. Densonucleosis virus: electron microscope morphology after density gradient purification and fluorescent aspect. *Bact. Proc.*, 105: 162.
- Kurstak, E., Côté, J.R., Stanislawski-Birencwajg, M., 1968b. The polytropic nature of the densonucleosis virus. 1st Intern. Congr. Virology, Helsinki. *Prog. med. Virol.*, (sous presse)
- Kurstak, E., Garzon, S., Goring, I., Côté, J.R., 1968c. Parasitisme des cellules intestinales de *Galleria mellonella* L. par le virus de la denisonucléose. *Rev. can. Biol.*, 27: 261-265.
- Kurstak, E., Goring, I., Garzon, S., Côté, J.R., 1968d. Etude de la denisonucléose de *G. mellonella* L. par les techniques de fluorescence. *Naturaliste can.*, 95: 773-783.
- Kurstak, E., Trudel, M., Chagnon, A., Hudon, C., 1967. Inhibition de la cytodierèse des cellules de souris cultivées "in vitro" au contact du virus de la denisonucléose. *Rev. can. Biol.*, 26: 355-357.
- Kurtz, S.M., 1961. A new method for embedding tissues in Vestopal. *J. Ultrastruct. Res.*, 5: 468-469.

- Langeron, M., 1949. *Précis de microscopie*. Masson, Paris, 1630 p.
- Lauffer, M.A., 1944. The influence of concentration upon the sedimentation rate of tobacco mosaic virus. *J. am. Chem. Soc.*, 66: 1195-1201.
- Le Bouvier, G.L., 1957. Poliovirus precipitins. A study by means of diffusion in agar. *J. exp. Med.*, 106: 661-679.
- Leduc, E., Avrameas, S., Bouteille, M., 1968. Ultrastructural localization of antibody in differentiating plasma cells. *J. exp. Med.*, 127: 109-118.
- Lee, P.E., Furgala, B., 1968. Sacbrood virus. Some morphological features and nucleic acid type. *J. Invert. Pathol.*, 7: 502-505.
- Leers, W.D., Rozee, K.R., Wardlaw, A.C., 1968. Immunodiffusion and immunoelectrophoretic studies of reovirus antigens. *Can. J. Microbiol.*, 14: 161-164.
- Lépine, P., 1964. *Techniques de laboratoire en virologie humaine*. Masson, Paris. 831 p.
- Leutenegger, R., 1964. Development of an Icosahedral virus in hemocytes of *Galleria mellonella* L. *Virology*, 24: 200-204.
- L'Héritier, P., 1948. Sensitivity to CO₂ in *Drosophila*. A review. *Heridity*, 2: 325-348.
- L'Héritier, P., 1958. The heredity virus of *Drosophila*. *Adv. Virus Res.*, 5: 195-244.
- Lieberman, I., Ove, P., 1960. Enzymes studies with mutant mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, 235: 1765-1768.
- Lison, L., 1960. *Histochimie et cytochimie animales*. I et II, Gauthier-Villars, Paris, 842 p.
- Longworth, J.F., Tinsley, T.W., Barwise, A.M., Walker, I.D., 1968. Purification of a non-occluded virus of *Galleria mellonella*. *J. gen. Virol.*, 3: 167-174.
- Lotmar, R., 1941. Die Polyederkrankheit der Kleindermotte *Tineola bisselliella*, Mitt. schweiz. Entomol., 18: 372-373.

- Lwoff, A., Tournier, P., 1966. The classification of viruses. *Ann. Rev. Microbiol.*, 20: 45-74.
- Maestri, A., 1856. Del giallume. In *Frammenti anatomiche, fisiologici e patologici, sul bac da sita*. 117-120. Fusi, Pavia.
- Mansi, W., 1957. The study of some viruses by the plate gel diffusion precipitin test. *J. comp. Path.*, 67: 297-303.
- Maramorosch, K., 1968. (éd.) Insect viruses. In *Current topics in microbiology and immunology*, 42: Springer-Verlag, New-York, 192 p.
- Maramorosch, K., Koprowski, H. (éd.), 1967. *Methods in virology*. Academic Press, New-York. I, 640 p.; II, 682 p.; III, 677 p..
- Maramorosch, K., Koprowski, H., (éd.) 1968. *Methods in virology*. Academic Press, New-York, IV, 764 p.
- Markham, R., Frey, S., Hills, G.J., 1963. Methods for the enhancement of image detail and accentuation of structure in electron microscopy. *Virology*, 20: 88-102.
- Markham, R., Hitchburn, Hills, G.J., Frey, S., 1964. The anatomy of tobacco mosaic virus. *Virology*, 22: 342-359.
- Martignoni, M.E., 1960. Problems of insect tissue culture. *Experientia*, 26: 125-128.
- Martignoni, M.E., 1962. Insect tissue culture, a tool for the physiologist. In *Insect Physiology*. Proc. 23rd Biology colloquium. Oregon State University Press, Corvallis, Oregon, 88-110.
- Mayor, H.D., 1961. Cytochemical and fluorescent antibody studies on the growth of poliovirus in tissue culture. *Texas report biol. med.*, 19: 106-122.
- Mayor, H.D., 1962. Biophysical studies on viruses using the fluorochrome acridine orange. *Prog. med. virol.*, 4: 70-86.

- Mayor, H.D., Divan, A.R., 1961. Studies on the acridine orange staining of two purified RNA viruses: poliovirus and tobacco mosaic virus. *Virology*, 14: 74.
- Mayor, H.D., Jamison, R.M., 1966. Morphology of small viral particles and subviral components. *Proc. med. Virol.*, 5: 183-213.
- Mayor, H.D., Jamison, R.M., Jordan, L.E., Melnick, J.L., 1965. Structure and composition of a small particle prepared from a simian adenovirus. *J. Bacteriol.*, 90: 235-242.
- Meynadier, G., Vago, C., Plantevin, G., Atger, P., 1964. Virose d'un type inhabituel chez le Lépidoptère *G. mellonella* L. *Rev. Zool. agr. appl.*, 63: 207.
- Melnick, J.L., Mayor, H.D., Smith, K.O., Rapp, F.J., 1965. Association of 20 – millimicron particles with adenoviruses. *J. Bacteriol.*, 90: 271-277.
- Morgan, C., Rifkind, R.A., Hsu, K.C., Holden, M., Seegal, B.C., Rose, H.M., 1961. Electron microscopic localization of intracellular viral antigen by the use of ferritin-conjugated antibody. *Virology*, 14: 292.
- Morris, O.N., 1968. Autoradiographic studies of DNA synthesis on normal and in polyhedrosis virus infected Lepidoptera. *J. Invert. Pathol.*, 10: 28-38.
- Nakane, P.K., Pierce, G.B.J., 1966. Enzyme-labelled antibodies. Preparation and application for the localization of antigens. *J. Histochem. Cytochem.*, 14: 929-939.
- Nakane, P.K., Pierce, G.B., 1967. Enzyme-labelled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. *J. Cell Biol.* 33: 307.
- Onodera, K., Komano, T., Hemeus, M., Sakai, F., 1965. The nucleic acid of nuclear-polyhedrosis virus of the silkworm. *J. mol. Biol.*, 13: 532-533.
- Ouchterlony, O., 1949a. Antigen antibody reaction in gels. II: Factors determining the site of the precipitate. *Arch. Kemi.*, 1: 43-48.

- Ouchterlony, O., 1949b. Antigen-antibody reactive in gels. III: The time factor. *Arch. Kemi.*, 1: 55-59.
- Ouchterlony, O., 1953. Antigen-antibody reactions in gels. IV: Types of reactions in coordinated systems of diffusion. *Acta pathol. microbiol. scand.*, 32: 231-240.
- Paillot, A., 1926. Sur une nouvelle maladie du noyau ou grasserie des chenilles de *P. brassicae* et un nouveau groupe de microorganismes parasités. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 185: 673-675.
- Paillot, A., Gratia, A., 1939. Essai d'isolement du virus de la grasserie du vers à soie par l'ultracentrifugation. *Arch. ges. Virusforsch.* 1: 120-129.
- Palade, G.E., 1952. Study of fixation for electron microscopy. *J. exp. Med.*, 95: 285-298.
- Pasteur, L., 1870a. *Etudes sur la maladie des vers à soie. I* - Gauthier-Villars, Paris, 322 p.
- Pasteur, L., 1870b. *Etudes sur la maladie des vers à soie. II* - Gauthier-Villars, Paris, 327 p.
- Pearse, A.E., 1968. *Histochemistry*. Churchill, Londres, 754 p.
- Plus, N., Atanasiu, P., 1966. Sélection d'un mutant du virus rabique adapté à un insecte. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 263: 89-92.
- Ram, J.S., Nakane, P.K., Rawbinson, D.G., Pierce, G.B., 1966. Enzyme labelled antibodies for ultrastructural studies. *Fed. Proc.*, 25: 732.
- Reed, L.J., Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.*, 27: 495-497.
- Reiner, L., 1930. On the chemical alteration of purified antibody proteins. *Science*, 72: 483-484.
- Reynold, F.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 17: 208-213.

- Rogers, A.W., 1967. *Techniques of Autoradiography*. Elsevier, New-York, 325 p.
- Sabatini, D.D., Bensch, K.O., Barnett, R.J., 1963. Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell Biol.*, 17: 19-58.
- Salzman, N.P., Sebring, E.D., 1961. The source of poliovirus ribonucleic acid. *Virology*, 13: 258-260.
- Scott, G., Avrameas, S., Bernhard, W., 1968. Etude au microscope électronique de la formation d'anticorps à l'aide de la phosphatase alcaline, utilisée comme antigène. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 266: 746-748.
- Singer, S.J., 1959. Preparation of an electron dense antibody conjugate. *Nature*, 183: 1523-1524.
- Singer, S.J., Schick, A.F., 1961. The properties of specific stains for electron microscope prepared by the conjugation of antibody molecules with ferritin. *J. biophys. biochem. Cytol.* 9: 519.
- Sjöstrand, F.S., Elfvin, L.G., 1962. The layered asymmetric structure of the plasma membrane in the exocrine pancreas cells of the cat. *J. Ultrastruct. Res.*, 7: 504-534.
- Smith, K.M., 1951. The polyhedral diseases of insects. *Endeavour*, 10: 194-198.
- Smith, K.M., 1963. Cytoplasmic virus diseases. In *Insect Pathology*, an advance treatise. I, 457-497. Steinhaus, (éd.) Academic Press, New-York, 661 p.
- Smith, K.M., 1967. *Insect Virology*. Academic Press, New-York, 256 p.
- Smith, K.M., Hills, G.H., 1959. Further studies on the electron microscopy of the *Tipula iridescent* virus. *J. mol. Biol.*, 1: 277-280.
- Smith, K.M., Hills, G.H., 1960. Multiplication and ultrastructure of insect viruses. *XI Internationaler Kongres für Entomologie*, Wien, Band II: 823-827.

- Smith, K.M., Hills, G.H., 1962. Ultrastructure and replication of insect viruses. *Proc 5th Intern. Congr. Electron Microscopy*, Philadelphie, 2,V-1.
- Smith, K.M., Wyckoff, R.W.G., 1950. Structure within polyhydra associated with insect virus diseases. *Nature*, 166: 861.
- Smith, K.O., Gehle, W.D., Thiel, J.F., 1966. Properties of a small virus associated with adenovirus type 4. *J. Immunol.*, 97: 754-766.
- Sohier, R., 1964. *Diagnostic des maladies à virus*. Flammarion, Paris, 927 p.
- Steinhaus, E.A., 1949. Nomenclature and classification of insect viruses. *Bacteriol. Rev.*, 13: 203-223.
- Steinhaus, E.A., 1953. Taxonomy of insect viruses. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 56: 537.
- Steinhaus, R.A., Leutenegger, R., 1963. Icosahedral virus from a scarab, *Sericesthis*. *J. Insect Pathol.*, 5: 266-270.
- Tanada, Y., 1956. Size of a granulosis virus of *Pieris rapae* L. *Proc. Hawaiian Entomol. Soc.*, 16: 156-157.
- Tarasevitch, L.M., 1946. On the nucleic acid of the polyhedrosis of the mulberry silkworm. *Mikrobiol., U.R.S.S.*, 15: 337-340.
- Thomas, R.S., Williams, R.C., 1961. Localization of DNA and protein in *Tipula iridescent* virus by enzymatic digestion and electron microscopy. *J. biophys. biochem. Cytol.*, 11: 15-29.
- Tournier, P., Granboulan, N., Bernhard, W., 1961. Examen au microscope électronique des cellules de rein de *Cercopithèque* infectées in vitro par le virus SV 40. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 253: 2283-2285.
- Trager, W., 1935. Cultivation of the virus of grasserie in silkworm tissue cultures. *J. exp. Med.*, 61: 501-513.

- Truffaut, N., Berger, G., Niveleau, A., May, P., Bergoin, M., Vago, C., 1967. Recherches sur l'acide nucléique du virus de la denonnucléose du Lépidoptère *G. Mellonella* L. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 21: 469-474.
- Vago, C., 1959. Recherches sur la culture de tissus en virologie des insectes. *Entomophaga*, 4: 23-26.
- Vago, C., (éd.), 1962. Premier colloque international sur la culture de tissus des invertébrés. Montpellier, 22-24 octobre, 1962. *Ann. Epiph.*, 14: 222 p.
- Vago, C., 1967. Invertebrate tissue culture. In *Methods in virology*, 1: 567-602. Maramorosch et Koprowski, éd., Academic Press, New-York, 640 p.
- Vago, C., 1968. Non-inclusion virus diseases of invertebrates. In *Current Topics in Microbiology and immunology*, 42: 24-37. Maramorosch, éd., Springer-Verlag, New-York, 192 p.
- Vago, C., Chastang, S., 1958. Obtention de lignées cellulaires en culture de tissus d'invertébrés. *Experientia*, 14: 110-113.
- Vago, C., Croissant, O., 1964. Etude morphologique du virus de la maladie à fuseaux du coléoptère. *Entomophaga*, 1: 207-210.
- Vago, C., Luciani, J., 1965. Développement du virus de la maladie des noyaux denses de *Galleria mellonella* en culture de tissus de Lépidoptères. *Experientia*, 21: 393.
- Vago, C., Croissant, O., Lépine, P., 1955. Démonstration au microscope électronique du développement intracellulaire du virus de la grasserie. *Ann. Inst. Pasteur*, 89: 364-366.
- Vago, C., Croissant, O., Lépine, P., 1959. Processus de l'infection à virus à partir du corps d'inclusion de polyédrie cytoplasmique ingéré par le Lépidoptère sensible. *Mikroskopie*, 14: 36-40.
- Vago, C., Duthoit, J.L., Delahaye, F., 1966a. Les lésions nucléaires de la "virose à noyaux denses" du Lépidoptère *Galleria mellonella* L. *Arch. ges. Virusforsch.*, 18: 344-349.

- Vago, C., Meynadier, G., Duthoit, J.L., 1964. Etude d'un nouveau type de maladie à virus chez le Lépidoptère. *Ann. Epiph.*, 15: 475-500.
- Vago, C., Monsarrat, P., Duthoit, J.L., Amargier, A., Meynadier, G., 1968. Nouvelle virose à fuseau observée chez un lucanide (Coléoptère) de Madagascar. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 266: 1621-1623.
- Vago, C., Quiot, J.M., Luciani, J., 1966b. Infection de culture de tissus de Lépidoptères avec le virus purifié de la denisonucléose. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 263: 799-800.
- Valentine, R.C., Hopper, P.E., 1957. Polyhedral shape of adenovirus particles as shown by electron microscopy. *Nature*, 180: 928.
- Vaughn, S.L., Faulkner, P., 1963. Succesptibility of an insect tiwsue culture to infection by virus preparations of the nuclear polyhedrosis of the silkworm *Bombyx mori* L. *Virology*, 20:484-489.
- Weiser, J., 1965. Vagoiavirus gen. n., a virus causing disease in insects. *J. Invert. Pathol.*, 7: 82-85.
- White, G.F., 1917. *Sacbrood*, U.S. dept. Agr. Bull. 431.
- Williams, R.C., Smith, K.M., 1957. Structure of an insect virus. *J. appl. Phys.*, 28: 1369.
- Williams, R.C., Wyckoff, R.W.G., 1946. Applications of metallic shadow-casting to microscopy. *J. appl. Phys.*, 17: 23-33.
- Wyatt, S.S., 1956. Cultures "in vitro" of tissue from silkworm *Bombyx mori* L. *J. gen. Physiol.*, 39: 841-852.
- Xeros, N., 1952. Cytoplasmic polyhedral virus diseased. *Nature*, 170: 1073.
- Xeros, N., 1953. Development of intranuclear inclusions in virus diseased. cells of Lepidopterous larvae. *Nature*, 172: 309-310.
- Xeros, N., 1954. A second virus disease of the leatherfacket *T. paludosa*, *Nature*, 174: 562.

APPENDICE

TABLE I

Le fixateur au formol neutre (Lillie, 1965) *

Solution de formaldéhyde à 40%	100 ml
Eau distillée	900 ml
Phosphate monosodique de sodium	4.0 g.
Phosphate disodique de sodium	6.5 g.

Mode de fixation: 24-36 heures à 4°C

* Lillie, R.D., 1965. *Histopathologic technics and practical histochemistry*.
McGraw Hill Book Co., New-York, 715 p.

TABLE II

Le fixateur de Carnoy (Humason, 1967)

Chloroforme	30 ml
Alcool éthylique absolu	60 ml
Acide acétique glacial	10 ml

Mode de fixation: 24-36 heures à 4°C

TABLE III

Le fixateur de Helly (Langeron, 1949)

Bichromate de potassium	2.5 g.
Bichlorure de mercure	5.0 g.
Sulfate de sodium	1.0 g.
Eau distillée	100.0 ml
Formol neutre	5.0 ml

Mode de fixation: 24 heures à 4°C

TABLE IV

La coloration Giemsa - érythrosine (Langeron, 1949).

Exécution de la coloration:

- a) Déparaffinage et hydratation des préparations
- b) Colorant Giemsa (Chroma) 30 minutes
- c) Eau distillée neutre rincer
- d) Erythrosine (Chroma) à 1% 15-20 secondes
- e) Eau distillée neutre rincer rapidement
- f) Essorer au papier filtre
- g) Alcool amylique 30 secondes
- h) Eclaircir au xylol et monter.

TABLE V

Technique de Feulgen (Lillie, 1965)

- a) Réactif de Schiff (Kasten et al., 1959)
 - p-Rosaniline (Chroma) .06 g
 - Eau distillée 300 ml
 - Hydrosulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) 6.0 g
- b) Solution de lavage (Humason, 1967)
 - Acide chlorhydrique concentré 1.0 ml
 - Eau distillée 100.0 ml
 - Bisulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) 0.4 g
- c) Solution de Vert-lumière (fast green) (Humason, 1967)
 - Fast green (C.I.42053, Fisher Sci.) 0.1 g
 - Alcool éthylique à 95% 100.0 ml

Exécution de la réaction (Humason, 1967)

- 1- Déparaffinage et déshydratation des coupes
- 2- HC1 N 2 minutes
- 3- HC1 N 60°C 6-8 minutes
- 4- HC1 N rincer
- 5- Eau distillée rincer
- 6- Réactif de Schiff 20-40 minutes
- 7- Solution de lavage 3 bains: 2 min. chacun
- 8- Eau courante 5 minutes
- 9- Vert-lumière 5-10 secondes
- 10- Déshydratation et montage

TABLE VI

Technique de coloration à l'orangé d'acridine (Dart et Turner 1959)

a) Tampon McIlvaine pH 3.8

- Phosphate de sodium Na_2HPO_4	10.1 g
- Acide citrique monohydraté	13.55 g
- Eau distillée	1.0 l

b) Orangé d'acridine

- Orangé d'acridine (C.I.46005, Fisher Sci.)	1.09 g
- Eau distillée	1.0 l
- "Tween 80" (Fisher Sci.)	2.0 ml

On mélange 9 parties de la solution a, avec 1 partie de la solution b.

Exécution de la réaction

1- Déparaffinage des coupes	
2- Déshydratation en alcool éthylique	
3- Acide citrique à 1 %	1 minute
4- Eau distillée	rincer
5- Tampon McIlvaine pH 3.8	3 minutes
6- Orangé d'acridine 1:10,000	5 minutes
7- Tampon McIlvaine	3 minutes
8- Tampon McIlvaine	3 minutes
9- Montage (Harleco Fluor.Mount) *	

* Hartmann Leddon Co. U.S.A.

TABLE VII

Technique de coloration à l'acriflavine Schiff (Lillie, 1965)

a) Réactif de Schiff fluorescent (Culling et Vassar, 1961)

- Acriflavine dihydrochloride	1	g
- Métabisulfite de potassium	2	g
- Eau distillée	200	ml
- HCl N	20	ml

b) Alcool acide

- Alcool à 70%	99	ml
- Acide chlorhydrique concentré	1	ml

Exécution de la réaction

- 1- Déparaffinage des coupes
- 2- Déshydratation en alcool éthylique
- 3- HCl n: 60°C ou HCl 6 N à 25°C 10 minutes
- 4- Eau distillée rincer
- 5- Schiff fluorescent 20 minutes
- 6- Alcool acide 3 bains de 15 minutes chacun
- 7- Déshydratation à l'alcool absolu
- 8- Eclaircissement et montage

TABLE VIII

Le fixateur à la glutaraldéhyde (Sabatini, Bensch et Barnett, 1963)

a)	Tampon Michaelis	
	- Acétate de sodium	19.428 g
	- Véronal de sodium	29.428 g
	- Eau distillée, ad	1.0 l
	- pH : 9.0 - 9.4	
b)	Solution de travail	
	- Glutaraldéhyde à 25%	20 ml
	- Tampon Michaelis	80 ml
	- pH : 7.2 - 7.4	

Concentration finale 1 : 5-6%

0.05 - 0.1 M, pH 6.8 - 7.6

Temps: 1/2 heure à 4 heures à 4°C.

Lavage: solution tampon et sucrose de même molarité que le fixateur.

TABLE IX

Le fixateur à l'acide osmique (Palade, 1952)

a)	Tampon véronal	
	- Véronal de sodium	2.89 g
	- Acétate de sodium	1.15 g
	- Eau distillée, ad	100.0 ml
b)	Solution-mère d'acide osmique	
	- OsO ₄	1.0 g
	- Eau distillée	50.0 ml
c)	Solution de travail	
	- Solution-mère d'acide osmique	12.5 ml
	- Tampon véronal	5.0 ml
	- Eau distillée	2.5 ml
	- HCl N ±	5.0 ml
	- pH : 7.3 - 7.5	

TABLE X

Technique d'enrobage au Vestopal * (Kellenberger et al., 1956)

a) Déshydratation

- Acétone à 30 %	15 min.
- Acétone à 50 %	15 min.
- Acétone à 75 %	15 min.
- Acétone à 90 %	15 min.
- Acétone à 100 %	15 min.
- Acétone à 100 %	30 min.

b) Imprégnation au Vestopal D

- Vestopal à 25% en acétone	30 min.
- Vestopal à 50% en acétone	30 min.
- Vestopal à 75% en acétone	30 min.
- Vestopal W	30 min.

c) Enrobage au Vestopal W

- Vestopal W + 1% d'initiateur + 1% d'activateur p/p

d) Polymérisation

- 24 heures à 60°C.

* (Polysciences, Inc. U.S.A.)

TABLE XI

DOUBLE COLORATION (ECHLIN, 1964).

Technique de coloration à l'acétate d'uranium (Sjöstrand et Elfvin, 1962)

Coloration positive

Acétate d'uranium	2.0 g
Eau bi-distillée	50.0 ml
Durée de la coloration	20.0 minutes

TABLE XII

Technique de coloration au citrate de plomb (Reynolds, 1963)

Eau bi-distillée	42 ml
Citrate de sodium	1.76 g.
Nitrate de plomb	1.33 g.
Solution de soude 1N	8. ml
pH : 12 ± 0.1	
Durée de coloration	7 minutes

TABLE XIII

Technique de coloration au phosphotungstate (Brenner et Horne, 1959).

Acide phosphotungstique	2	g.
Eau distillée	100	ml
Hydroxyde de potassium 0.1 N	ad pH 6.5 ou 7.0	

TABLE XIV

Technique de coloration au zirconium

Solution mère		
ZrO_2	14.32	g
H_2O bi-distillée	100	ml
Solution colorante		
Solution mère	10	ml
Sucrose	0.2	g.
Eau bi-distillée	60	ml
pH 7.1 ajusté avec HCl 1N.		

TABLE XV

Conjugaison d'IgG à la peroxydase (Avrameas et Bouteille, 1968)

- | | | |
|-------------------------------|----|----|
| a) IgG | 5 | mg |
| Peroxydase de raifort | 12 | mg |
| Tampon phosphate 0.1 M pH:6.8 | 1 | ml |
- b) Agiter doucement et ajouter goutte-à-goutte:
 Glutaraldéhyde à 1% 0.05 ml
- c) Agiter durant 2 heures à la température de la pièce et dialyser contre 2 bains de 5 litres de saline physiologique tamponnée, à 4°C durant 16 heures.
- d) Enlever le précipité formé par centrifugation durant 30 minutes à 27,000 g. Cette solution mère d'anticorps conjugués à la peroxydase est conservée à 4°C.

Mode d'utilisation

- a) Microscopie photonique
- Fixation des frottis
 Alcool 6 parties, éther 40 parties
 - Marquage
 Immerger durant 2-4 heures dans la solution de peroxydase diluée 10 fois avec le tampon PBS- rincer au PBS
 - Colorer au Nadi
- b) Microscopie électronique
- Fixation: Paraformaldéhyde à 1.25% en tampon PBS,
 pH: 7.3 15 min. - 1 heure
 - Marquage: Sur coupes de 10 microns faites au cryostat
- Immerger / Solution de peroxydase diluée 10 fois avec le tampon PBS,
 pH : 7.3 durant 24 - 48 heures.

RÉSUMÉ

Plusieurs auteurs ont décrit le mode de réplication et la morphologie de nombreux virus d'insectes. L'ultrastructure de ces virus nous est connue grâce à la microscopie électronique. On peut distinguer deux grandes classes parmi ces virus, ceux inclus dans un cristal protéique, et les particules virales non incluses.

Le virus de la densonucléose (VDN) fait partie de ce dernier groupe. Il a été découvert récemment, et d'après les publications parues jusqu'ici, le VDN semble se rapprocher des virus de vertébrés. Si les aspects histopathologiques, histochimiques et immunologiques ont fait l'objet d'études, les données concernant la réplication et la morphologie de ce virus nous ont semblé particulièrement incomplètes. Ces dernières constatations nous ont intéressé et nous avons étudié au cours de ce travail par des techniques nouvelles les lésions cellulaires causées par ce virus, son mode de réplication et sa morphologie. Les résultats exposés ont été comparés avec ceux d'autres auteurs, et nous avons exposé à la fin de ce travail, une proposition de classification du VDN dans un système reconnu.

Plusieurs techniques ont été utilisées lors de cette étude et nous en avons exposé les avantages et les inconvénients, puis nous en avons développé la méthodologie.

Nous avons étudié la réplication du virus de la densonucléose au niveau de l'hypoderme et des glandes séricigènes des larves de *Galleria mellonella* Linn. (Lepidoptera), par la microscopie photonique et spécialement par la microscopie électronique.

En microscopie photonique, nous avons suivi l'histopathogénèse de la densonucléose au moyen de l'histochimie, de l'immunofluorescence, de l'immunoperoxydase et de l'autoradiographie.

En microscopie électronique, l'étude de la réplication du VDN s'est faite sur coupes ultrafines. Les tissus provenaient de larves a) infectées, b) infectées et traitées par l'immunoperoxydase, c) infectées et marquées par la thymidine tritiée. Des coupes ultrafines de larves saines ont également été réalisées et comparées.

Nous avons aussi étudié l'ultrastructure du VDN purifié et concentré par diverses méthodes: techniques de diagnostic, ultracentrifugation différentielle et ultracentrifugation en gradient de sucrose. Les virus purifiés ont été contrastés par l'acide phosphotungstique et examinés au microscope électronique.

* * *

Les résultats obtenus par les techniques d'immunohistochimie indiquent la localisation intranucléaire précise du VDN, 10 à 12 heures après l'infection des larves. Nous avons contrôlé la spécificité des immunsérums utilisés par la technique d'Ouchterlony de double diffusion latérale en gel, réalisée en micro-technique.

L'orangé d'acridine à pH 3.8 nous a permis de vérifier les données obtenues par les techniques d'immunohistochimie. Cette coloration à l'orangé d'acridine nous a montré après 14 heures, le remplacement du matériel nucléaire par le matériel viral, dans les cellules de l'hypoderme et des glandes séricigènes. Vingt heures après l'infection, nous avons observé que le matériel viral avait remplacé presque entièrement le matériel cellulaire.

La réaction de Feulgen et les digestions enzymatiques à l'ADNase et à l'ARNase ont confirmé le site de réplication du VDN ainsi que sa nature ADN.

* * *

Nous avons pu suivre sur coupes fines, le mode de réplication du virus de la denisonucléose au microscope électronique. Entre 15 et 20 heures après l'infection des larves, le nombre de virions augmente considérablement dans les noyaux qui s'hypertrophient. Puis, on peut voir, lorsque l'incidence de coupe le permet, la rupture de la membrane nucléaire et le passage des virions dans le cytoplasme. Le matériel nucléaire est remplacé par les virions. Les virions se regroupent quelquefois en ensembles paracristallins.

Les résultats obtenus par les techniques d'immunoperoxydase et d'autoradiographie au niveau de la microscopie électronique ont révélé d'une part, le site nucléaire des antigènes viraux, et d'autre part, l'augmentation importante de la synthèse de la thymidine au niveau du noyau des cellules infectées.

Les micrographies électroniques réalisées à partir des particules virales isolées et purifiées, nous ont permis de voir l'ultrastructure du VDN et de prouver la présence d'une particule virale associée au virus de la denisonucléose. Cette particule associée se compare à celles décrites par d'autres auteurs lors de leurs études des adénovirus.

Quant à la particule virale même du virus de la denisonucléose, nous avons étudié sa morphologie après l'ombrage et la coloration négative des échantillons purifiés. Nous avons de plus analysé ces résultats par la technique de superposition périodique réalisée par la rotation des images enregistrées, et nous avons construit un modèle de grand format d'après les données livrées par ces différentes techniques.

L'étude de l'ultrastructure du virus de la denisonucléose nous a montré qu'il s'agit d'une particule icosaédrique de $200 \text{ \AA}$ de diamètre dont la capsidie présente 42 capsomères à centre creux, disposés sur les arêtes des triangles de la particule. Ce virus se présente sous des formes pleines et vides, ces dernières offrant

l'image d'une couronne composée de 12 capsomères disposés en cadran d'horloge, les autres capsomères étant masqués par l'acide phosphotungstique emplissant le centre de la particule virale.

La comparaison du mode de réplication du VDN avec celui d'autres virus, nous fait voir certaines similitudes avec les virions du SV-40 et du polyome. Nous avons de plus cité dans notre bibliographie, d'autres auteurs rapprochant le VDN de certains virus de vertébrés.

Une classification des virus, qui, au lieu de tenir uniquement compte de l'hôte d'origine, engloberait l'ensemble des données comparables entre les virus des vertébrés, des invertébrés et des plantes, faciliterait l'addition de virus nouveaux, tel celui de la denso nucléose. Les données acquises par d'autres auteurs, ajoutées à celle du présent travail, permettraient de classer le VDN dans une nouvelle famille, celle des Densoviridae, qui serait placée entre les familles de Parvoviridae et de Papilloviridae.

En conclusion, nous espérons que les données nouvelles apportées par ce travail, seront acceptées comme une contribution aux connaissances du virus de la denso nucléose et qu'elles pourront être utiles à d'autres chercheurs intéressés aux virus d'invertébrés et à la virologie comparée.

